

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Petra Darebná**

Charakterizace glykoform haptoglobinu v lidském séru

Characterization of haptoglobin glycoforms in human serum

**Diplomová práce**

Školitel: RNDr. Petr Pompach, Ph.D.

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Pompacha, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne .....

Petra Darebná .....

## **Poděkování**

Na prvním místě bych velice ráda poděkovala vedoucímu práce RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D. za pomoc a pevné nervy při realizaci této práce.

Dále děkuji Prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc. A PharmDr. Radkov Kučerovi, Ph.D. z Oddělení Nukleární Medicíny Nemocnice v Plzni za poskytnutí vzorků a spolupráci na projektu. Poděkování patří také Radoslavu Goldmanovi a Miloslavu Šandovi z Onkologického Oddělení Univerzity v Georgetownu za poskytnutí vzorků a pomoc s hmotnostně spektrometrickou analýzou.

Další poděkování patří členům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. za poskytnutí zázemí pro vypracování projektu a vytvoření přátelského prostředí pro práci.

Nakonec bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a partnerovi za poskytnutí podpory při mých studiích.

## **Abstrakt**

### **Charakterizace glykoform haptoglobinu v lidském séru**

**Petra Darebná**

*(Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Česká republika)*

Změny v glykosylaci proteinů jsou spojovány s nádorovými onemocněními, především s hepatocelulárním a kolorektálním karcinomem. Tato práce se zabývá využitím na datech nezávislé analýzy pomocí iontově cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací a tandemové hmotností spektrometrie s kapalinovou chromatografií a sledováním více reakcí ke kvantifikaci těchto změn u hepatocelulárního karcinomu, kolorektálního karcinomu a kolorektálního karcinomu s metastázemi do jater.

V první fázi projektu byl haptoglobin směsných sér pacientů s hepatocelulárním karcinomem, kolorektálním karcinomem a kolorektálním karcinomem s metastázemi nabohacen pomocí hemoglobinu, imobilizovaného na aktivovanou CNBr Sepharosu 4B a následně purifikován pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. Jednotlivé glykopeptidy haptoglobinu byly analyzovány pomocí iontově cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací.

V druhé fázi projektu byla použita pro analýzu změn glykosylace v závislosti na různém nádorovém onemocnění séra jednotlivých pacientů, u nichž byl částečně depletován albumin pomocí etanolového srážení. Jednotlivé fukosylované glykoformy N-glykopeptidů sérových proteinů byly porovnány s jejich nefukosylovanými formami. Zároveň byly ve stejném vzorku porovnány sialované O-glykopeptidy hemopexinu. Z naměřených dat byl pozorován nárůst fukosylovaných forem haptoglobinu, hemopexinu a komplement faktoru H a zároveň byl pozorován nárůst sialované formy hemopexinu u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a hepatitidou typu C. Pro kvantitativní analýzu glykopeptidů byly zvoleny dva odlišné hmotnostně spektrometrické přístupy – sledování více reakcí na trojitém kvadrupólu a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. Obě zvolené metody poskytly porovnatelné výsledky vhodné pro kvantifikaci změn glykosylace. Ze získaných výsledků kvantitativní analýzy glykopeptidů haptoglobinu a dalších sérových proteinů byly pozorovatelné významné změny struktur glykopeptidů především u pacientů s hepatocelulárním karcinomem a diagnostikovanou žloutenkou typu C oproti ostatním onemocněním a kontrole.

**Klíčová slova:** hmotnostní spektrometrie, trojitý kvadrupól, iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, hepatocelulární karcinom, glykosylace, etanolová deplece, hepatitida typu C

## **Abstract**

### **Characterization of haptoglobin glycoforms in human serum**

***Petra Darebná***

*(Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Česká republika)*

Changes in glycosylation of proteins are associated with several types of cancer, including hepatocellular carcinoma and colorectal carcinoma. This project deals with data independent analysis using ion cyclotron resonance with Fourier transform and tandem mass spectrometry with liquid chromatography and multiple reaction monitoring to quantify these changes in hepatocellular carcinoma and colorectal carcinoma with liver metastases.

In the first part of the project the haptoglobin was enriched from pooled serum samples of patients with hepatocellular carcinoma, colorectal cancer and colorectal carcinoma with metastases using hemoglobin immobilized on CNBr-activated Sepharose 4B and then purified by high pressure liquid chromatography. Individual haptoglobin glycopeptides were analyzed using ion cyclotron resonance with Fourier transform.

In the second part of the project we analyzed changes in glycosylation depending on different tumor diseases in partially depleted serum of individual patients using ethanol precipitation. Individual fucosylated glycoforms of N-glycopeptides of serum proteins were compared with their nonfucosylated forms. In addition, sialylated glycopeptides of hemopexin were quantified in the same sample. From the data, we observed increase in the fucosylated glycoforms of haptoglobin, hemopexin and complement factor H and at the same time was observed increase in sialylated glycoforms of hemopexin in patients with hepatocellular carcinoma and hepatitis C. For quantitative analysis of glycopeptides have been chosen two different mass spectrometric approaches - monitoring multiple reactions with triple quadrupole and ion cyclotron resonance with Fourier transform. Both selected methods gave comparable results suitable to quantify changes in glycosylation. Our results suggest that both approaches allow adequate quantification of glycopeptides and suggest that hepatocellular carcinoma of hepatitis C etiology differs in glycosylation from colorectal cancer and liver metastasis of colorectal cancer.

Key words: mass spectrometry, triple quadrupole, ion cyclotron resonance with Fourier transformation, hepatocellular carcinoma, glycosylation, ethanol depletion, hepatitis C

## Obsah

1	Seznam zkratk .....	8
2	Úvod.....	10
2.1	Glykosylace.....	10
2.1.1	N-glykosylace .....	10
2.1.2	O-glykosylace .....	12
2.1.3	Funkce O-glykosylace .....	12
2.1.4	Funkce glykosylace.....	14
2.2	Změny struktury N-glykanů vlivem onemocnění .....	14
2.3	Hepatocelulární karcinom .....	16
2.3.1	$\alpha$ -fetoprotein-L3.....	18
2.4	Haptoglobin.....	18
2.4.1	Funkce.....	18
2.4.2	Struktura.....	19
2.4.3	Změny glykosylace Hp vlivem onemocnění .....	19
2.5	Hmotností spektrometrie .....	21
2.5.1	Studium glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (glykomika/glykoproteomika) .....	21
2.5.2	Fragmentační metody .....	22
2.5.3	Zdroj iontů/ Ionizace elektrosprejem .....	23
2.5.4	Hmotnostní analyzátory .....	24
2.5.5	Analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (FT-ICR) .....	26
3	Cíl práce .....	28
4	Materiál.....	29
4.1	Biologický materiál .....	29
4.2	Použité chemikálie .....	29
4.3	Přístroje a pomůcky.....	30
4.4	Seznam roztoků.....	30
4.5	Softwarové vybavení.....	31
5	Experimentální metody .....	32
5.1	Analýza glykosylace molekuly haptoglobinu u pacientů s různými onemocněními .....	32

5.1.1	Vzorky .....	32
5.1.2	Izolace haptoglobinu ze směsného krevního séra .....	32
5.1.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace haptoglobinu za pomoci kyseliny Bicinchoninové .....	33
5.1.4	Štěpení haptoglobinu trypsinem a odstranění sialových kyselin pomocí neuraminidasy .....	34
5.1.5	Hmotnostně spektrometrická analýza .....	34
5.2	Analýza sérových glykoproteinů jednotlivých patientských vzorků.....	35
5.2.1	Vzorky .....	35
5.2.2	Deplece albuminu .....	35
5.2.3	Příprava vzorků pro hmotnostně spektrometrickou analýzu .....	36
5.2.4	Hmotnostně spektrometrická analýza pomocí FT-ICR .....	36
5.2.5	Hmotnostně spektrometrická analýza pomocí MRM .....	37
5.2.6	Vyhodnocení dat .....	37
6	Výsledky .....	39
6.1	Analýza glykosylace molekuly haptoglobinu u pacientů s různými onemocněními .....	39
6.1.1	Izolace haptoglobinu z krevního séra .....	39
6.1.2	Hmotnostně spektrometrická analýza molekuly haptoglobinu pacientů s různými onemocněními .....	40
6.2	Analýza sérových glykoproteinů jednotlivých patientských vzorků.....	42
6.2.1	Etanolová deplece albuminu .....	42
6.2.2	Hmotnostně spektrometrická analýza depletovaného séra .....	42
7	Diskuze .....	50
8	Závěr .....	54
9	Seznam použité literatury .....	55

## 1 Seznam zkratek

CD163	Receptor komplexu haptoglobin-hemoglobin (Cluster of Differentiation 163)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CID	Kolizi indukovaná disociace (Collision-Induced Dissociation)
CTRL	Kontrola (Control)
Cys	Aminokyselina cystein
Dol	Dolichol
Dol-P-P-GlcNAc	Dolichol pyrofosfát N-acetylglukosamin (Dolichol Pyrophosphate N-acetylglucosamin)
ECD	Disociace elektronovým záchytem (Electron Capture Dissociation)
ER	Endoplazmatické retikulum (Endoplasmic Reticulum)
ESI	Ionizace sprejem (Electrospray Ionization)
ETD	Disociace přenosem elektronu (Electron-Transfer dissociation)
eV	Elektronvolt
FT-ICR	Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
FUT	Fukosyltransferáza (Fucosyltransferase)
GA	Golgiho aparát (Golgi Apparatus)
Gal	Galaktóza
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GDP Fuc	Guanin difosfát fukóza (Guanine Diphosphate Fucose)
Glc	Glukóza (Glucose)
GlcNAc	N-acetylglukosamin (N-acetylglucosamin)
GnT III	N-acetylglukosaminyltransferáza (N-acetylglucosaminyltransferase)
Hb	Hemoglobin
HBV	Virus hepatitidy B (Hepatitis B Virus)
HCC	Hepatocelulární karcinom (Hepatocellular Carcinoma)
HCV	Virus hepatitidy C (Hepatitis C Virus)
HILIC	Kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí (Hydrophilic Interaction Chromatography)
Hp	Haptoglobin
Hp-Hb	Komplex haptoglobin-hemoglobin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
KR	Kolorektální karcinom
KR+JM	Kolorektální karcinom s metastázemi do jater
kV	Kilovolt
LCA	Lektin z čočky (Lens Culinaris Agglutinin)
Lex	Lewis X glykanová struktura
Ley	Lewis Y glykanová struktura
Lys	Aminokyselina lysin
m/z	Poměr hmoty ku náboji (mass-to-charge ratio)
MALDI	Ionizace/desorpce laserem za asistence matrice (Matrix Assisted Laser Ionization/Desorption)
Man	Manóza (Mannose)
MRI	Nukleární magnetická rezonance (Magnetic Nuclear Resonance)
MRM	(Multiple Reaction Monitoring)
OST	Oligosacharyltransferáza (Oligosacharyltransferase)
Q1	První kvadrupól
Q2	Druhý kvadrupól
Q3	Třetí kvadrupól
QQQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole Mass Spectrometer)



Ser	Aminokyselina serin
sLex	Lewis X glykanová struktura s kyselinou sialovou
Thr	Aminokyselina treonin
UDP	Uridin difosfát (Uridine Diphosphate)
UDP-GlcNAc	Uridin difosfát N-acetylglukosamin (Uridine Diphosphate N-acetylglucosamin)
WGA	Lektin z pšenice (Wheat Germ Agglutinin)
$\alpha$ 1,3/4FUT	$\alpha$ 1,3/4 fukosyltransferáza ( $\alpha$ 1,3/4 Fucosyltransferase)
$\beta$ 3GnT	$\beta$ 1,3-N-acetylglukosaminyltransferáza ( $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase)
$\beta$ 4GalT	$\beta$ 1,4-Galaktosyltransferáza IV ( $\beta$ 1,4-Galactosyltransferase)

## 2 Úvod

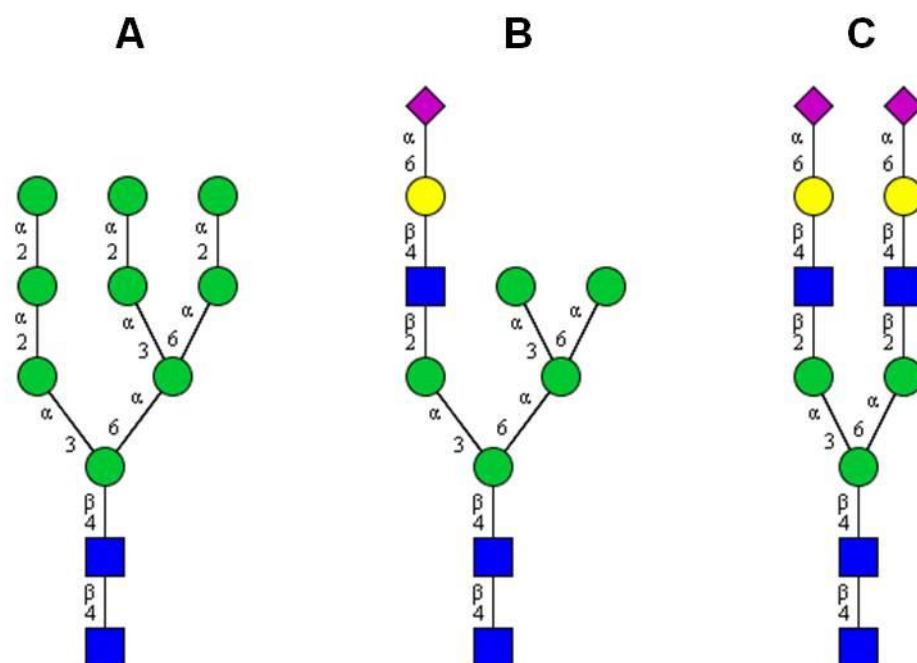
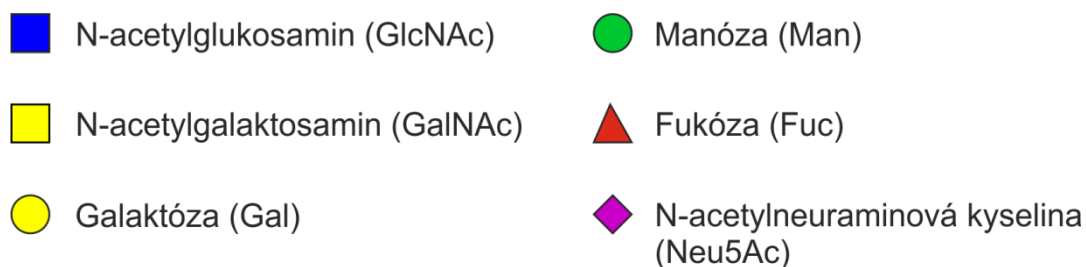
### 2.1 Glykosylace

Glykosylace je jednou z nejběžnějších posttranslačních modifikací proteinů. Glykosylační motiv nesou přibližně dvě třetiny všech známých proteinů a převážná většina glykoproteinů je syntetizována v játrech<sup>1</sup>. Glykosylované proteiny se dělí do dvou základních skupin dle typu vazby glykanu na peptidový řetězec. Jestliže je glykan připojen přes hydroxylovou skupinu aminokyselin serinu nebo threoninu jedná o tzv. O-glykosylaci. V druhém případě, kdy je glykan vázán přes amidovou skupinu asparaginu, nacházejícího se v konzervované sekvenci Asn-X-Ser/Thr (X představuje jakoukoli aminokyselinu kromě prolinu), jedná se o tzv. N-glykosylaci.

#### 2.1.1 N-glykosylace

Konzervovaný motiv pro N-glykosylaci nesou více než dvě třetiny všech známých proteinů. Doposud bylo popsáno pět různých typů vazeb glykanu na asparagin, z čehož nejčastějším je vazba glykanu přes anomerní uhlík C1 N-acetylglukosaminu (GlcNAc $\beta$ 1-Asn)<sup>2</sup>. Všechny N-glykany mají stejný základ neboli jádro, které je složeno ze tří manóz a dvou N-acetylglukosaminů následujícím způsobem: Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser/Thr. Na jádro jsou připojeny další monosacharidové zbytky. Pořadí monosacharidů a složení glykanu dále určuje rozdělení N-glykanů do tří skupin (Obrázek 1). 1) Oligomanóзовé N-glykany, které mají na jádro připojeny pouze manóзовé zbytky v různém počtu, 2) Komplexní N-glykany, tvořené N-acetylglukosaminem, galaktózou, případně kyselinou N-acetylneuraminovou (kyselinou sialovou) a fukózou a 3) hybridní N-glykany tvořené z části oligomanóзовým řetězcem a komplexním glykanem.

Komplexní N-glykany jsou nejběžnější sacharidovou strukturou objevující se na N-glykoproteinech<sup>2</sup>. Jejich struktura je proměnná a může se lišit v počtu ramen vázaných k manóзовých zbytkům jádra glykanu, počtu terminálních kyselin sialových nebo množství fukózy vázané k N-acetylglukosaminu jádra a ramen glykanu. Nejhojněji zastoupený je biantennární komplexní glykan s jednou nebo dvěma kyselinami silovými<sup>3</sup>.



**Obrázek 1** Typy základních N-glykanů s vyznačenými vazbami. Oligomanózový (A), hybridní (B) a komplexní dvouramenný N-glykan (C).

#### 2.1.1.1 *Syntéza N-glykanů*

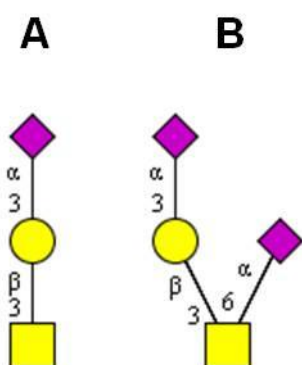
Proces biosyntézy N-glykanů začíná na cytoplazmatické straně endoplazmatického retikula (ER) přenosem aktivovaného N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc) na dolichol fosfát za vzniku dolichol pyrofosfát N-acetylglukosaminu (Dol-P-P-GlcNAc).

Následně je enzymem oligosacharyltransferázou (EC 2.4.1.119) přidáno 14 monosacharidových zbytků na Dol-P-P-GlcNAc a tato sacharidová struktura je přenesena na asparagin budoucího glykoproteinu během jeho syntézy a translokace přes membránu ER. Oligosacharyltransferáza (OST) je transmembránový protein lokalizovaný v membráně ER a je součástí translokonu. Je rovněž odpovědný za rozeznání asparaginu v konzervované sekvenci NXS/T na který má být připojen první N-acetylglukosamin<sup>4</sup>.

Glykan je dále upravován v ER a Golgiho aparátu (GA) sérií reakcí katalyzovaných glykosidázami a glykosyltransferázami vázanými v membráně ER a GA<sup>2</sup>. Tyto enzymy jsou citlivé k fyziologickým a biochemickým změnám stavu buňky, ve které je glykoprotein syntetizován a struktura glykanu odpovídá typu a fyziologickému stavu buňky, který může být změněn vlivem onemocnění.

### 2.1.2 O-glykosylace

O-glykan je kovalentně připojen přes *N*-acetylgalaktosaminový (GalNAc) zbytek k hydroxylové skupině aminokyselin serinu nebo threoninu glykosidickou vazbou. Nejjednodušší O-glykan, neboli Tn antigen, obsahuje pouze jeden *N*-acetylgalaktosaminový zbytek. Nejběžnějším O-glykanem je T antigen (Obrázek 2). T antigen je složen z Tn antigenu prodlouženého o galaktózu vazbou  $\beta$ 1-3 na GalNAc. Oba antigeny, T i Tn, mohou být modifikovány kyselinou sialovou. Připojení kyseliny sialové na C-3 galaktózy a C-6 *N*-acetylgalaktosaminu T antigenu dává glykanu negativní náboj a zabraňuje jeho další modifikaci.



**Obrázek 2** T antigen s jednou (A) a dvěma (B) kyselinami sialovými a vyznačenými vazbami.

### 2.1.3 Funkce O-glykosylace

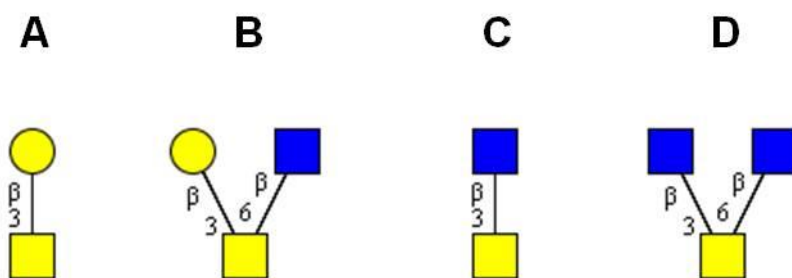
Jádro O-glykanu může být prodlouženo monosacharidy fukózou, galaktózou, *N*-acetylglukosaminem, kyselinou sialovou. Mezi další modifikace O-glykanů patří připojení sulfátu. Většina těchto koncových struktur je antigenní a rozpoznávána lektiny. Antigenní charakter glykosylace je využíván v mnoha dějích, ve kterých je nutné specifické rozeznávání, jako jsou imunologické reakce, kontakt buněk ve tkáních,

signalizace a syntéza proteinů. O-glykany jsou hydrofilní a v případě připojení kyseliny sialové nesou negativní náboj, který zajišťuje vazbu vody a solí a tím přispívají k viskozitě a adhezivitě O-glykoproteinů a tvoří přirozenou bariéru mezi tkáněmi<sup>2</sup>. O-glykosylace přispívá ke správné konformaci proteinu a brání jeho degradaci<sup>2</sup>.

### 2.1.3.1 Syntéza O-GalNAc glykanu

Syntéza je zahájena v Golgiho aparátu připojením aktivovaného N-acetylgalaktosaminu na hydroxylovou skupinu serinu nebo threoninu  $\alpha$ -GalNAc-transferázou<sup>5</sup>. O-glykosylace není determinována konzervovanou aminokyselinovou sekvencí a každá z  $\alpha$ -GalNAc-transferáz má jinou substrátovou specifitu<sup>6</sup>. Přítomnost prolinu v blízkosti serinu nebo threoninu je výhodou, protože dochází k jejich expozici do prostoru v důsledku  $\beta$ -otáčky způsobené prolinem<sup>2</sup>.

Připojením následujícího monosacharidového zbytku je určeno jádro glykanu. Jádro O-glykanů se dělí do čtyř základních strukturních skupin. První skupinu tvoří výše zmíněný T antigen (Gal $\beta$ 1-3GalNAc-) označovaný jako jádro 1, na jehož syntéze se podílí enzym  $\beta$ 3-Gal-transferáza<sup>5</sup>. Druhá skupina je tvořena T antigenem rozšířeným o N-acetylglukosamin - jádro 2. Jádro 3 je složeno z Tn antigenu s připojeným N-acetylglukosaminem a jádro 4 tvoří Tn antigen se dvěma N-acetylglukosaminy. Jednotlivé typy jader jsou znázorněny na Obrázku 3. Na syntéze jader 2 a 4 se rovněž podílí enzym  $\beta$ 6-GlcNAc-transferasa<sup>7</sup> a v případě jádra 2 se syntézy účastní navíc enzym  $\beta$ 3-Gal-transferáza. Jádro 3 je syntetizováno  $\beta$ 3-GlcNAc-transferázou<sup>5</sup>. Tyto specifické membránově vázané glykosyltransferázy jsou produkovány v ER a transportovány do GA, kde syntéza probíhá<sup>5</sup>.



**Obrázek 3** Základní typy jader O-GalNAc glykanů s vyznačenými vazbami. Prvními jádry jsou T antigen (A) tvořený N-acetylgalaktosaminem a galaktózou a T antigen větvený N-acetylglukosaminem (B). Dalším jádrem je N-acetylgalaktosamin s připojeným N-acetylglukosaminem (C) a poslední jádro obsahuje další větvení N-acetylglukosamin (D).

Nově vznikající O-glykan je syntetizován přímo na protein bez lipidového prekursoru a na rozdíl od syntézy N-glykanů v tomto procesu nefigurují žádné glykosidázy.

#### **2.1.4 Funkce glykosylace**

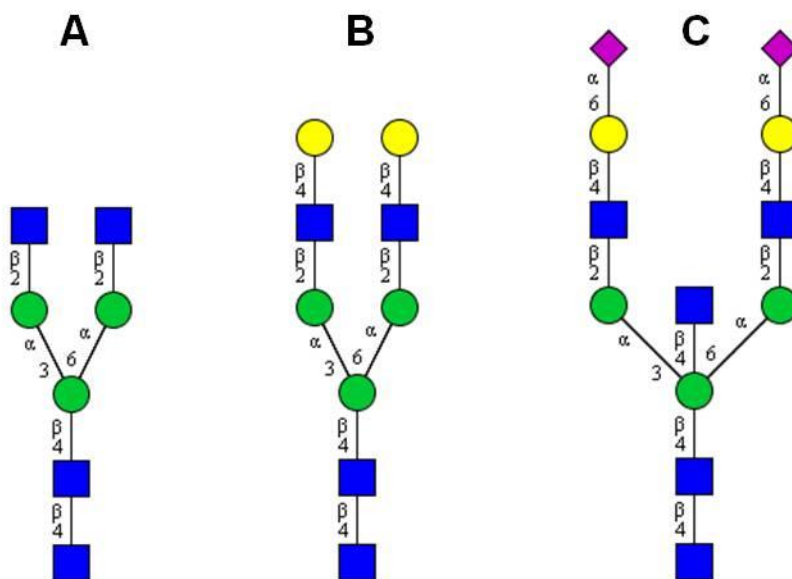
Glykosylace má mnoho funkcí, mezi které patří zajištění správné konformace proteinu, stabilita, vliv na rozpustnost, mezibuněčný a vnitrobuněčný transport a mnoho dalších funkčních vlastností proteinů. Sacharidové zbytky hrají důležitou roli v případě mezibuněčného kontaktu a komunikace, jako nástroj imunitního systému, signalizace a buněčné adheze. Stejně tak jsou díky glykosylaci rozpoznávány nebo naopak maskovány buňky rakovinného bujení<sup>8,9,10</sup>.

Dnes je již známo, že změny v glykosylaci jsou různou měrou a různým způsobem spojeny s patogenezí a progresí onemocnění.

### **2.2 Změny struktury N-glykanů vlivem onemocnění**

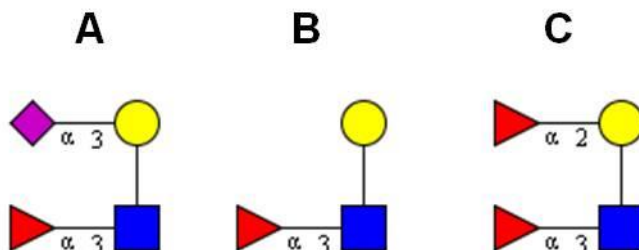
Játra jsou hlavním místem syntézy glykoproteinů krevní plazmy<sup>1</sup>. Onemocnění jater zásadně zasahují do glykosylačního aparátu a vedou ke změnám v produkci specifických glykosyltransferáz. Výsledkem je vznik typických sacharidových struktur<sup>1,11,12</sup>. Hepatocelulární karcinom (HCC) je případem rakovinného onemocnění, kdy dochází ke změnám v glykosylaci proteinů. K nemoci dochází po sérii chronických onemocnění, mezi která patří virus hepatitidy typu B a C (HBV/HCV) a cirhóza jater.

Existují dvě hlavní změny ve struktuře komplexních N-glykanů spojované s patologiemi jater nerakovinného původu. První je takzvaný větvicí GlcNAc, kdy je N-acetylglukosamin připojen vazbou  $\beta$ 1-4 k větvicí manóze glykanového jádra. Tato vazba je zprostředkována enzymem N-acetylglukosamintransferázou III (GnT III)<sup>13</sup>. Druhou změnou jsou glykany, které neobsahující koncovou kyselinu sialovou nebo galaktózu a jsou proto označovány jako asialo- a agalakto- glykany (Obrázek 4)<sup>14</sup>.



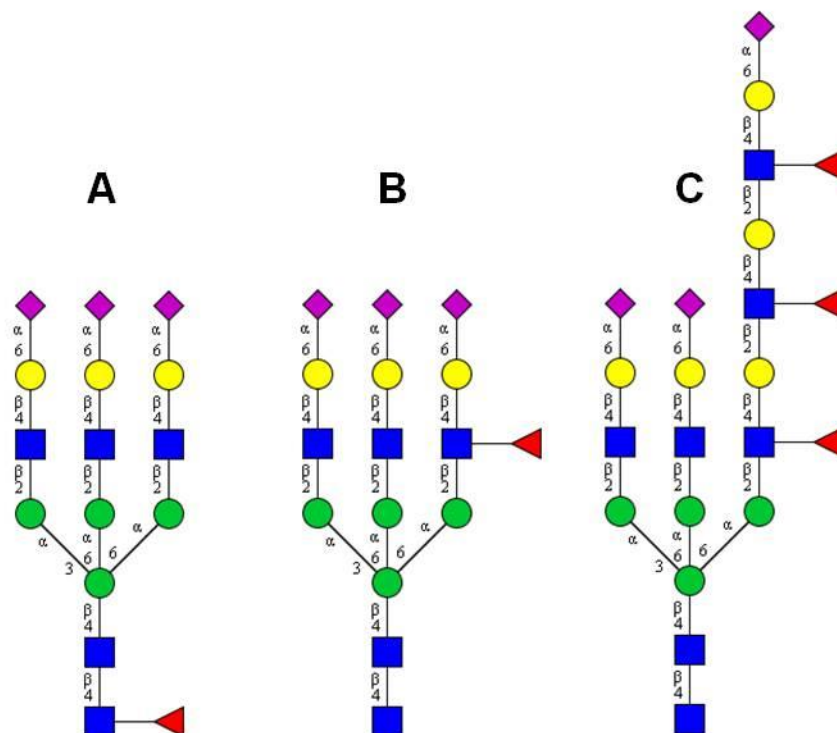
**Obrázek 4** Hlavní změny ve struktuře glykanů spojované s onemocněními nerakovinného původu. Bez kyseliny sialové (B) a galaktózy (A) a větvení glykanu pomocí N-acetylglukosaminu vázaného na manózu glykanového jádra (C).

Změny struktury N-glykanů (Obrázek 6) spojované s rakovinným bujením jsou především zvýšená fukosylace a tvorba poly-N-acetylglukosaminů. K připojení fukózy na glykan může dojít buď na jeho jádře nebo na jeho ramenech v závislosti na aktivitě příslušných fukosyltransferáz. Zvýšenou fukosylaci pozorujeme v důsledku změny exprese rodiny fukosyltransferáz  $\alpha 1,3/4$  ( $\alpha 1,3/4\text{FUT}$ )<sup>15</sup>, která má osm členů (FUT3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a 11), z čehož největší aktivita je přisuzována FUT6 a FUT8<sup>16</sup> jejichž vlivem pozorujeme nárůst fukosylace na jádře i ramenech glykanu. Vznikají Lewis glyko-epitopy sLeX, LeX a LeY (Obrázek 5)<sup>17,18</sup>.



**Obrázek 5** Lewis glyko-epitopy. SLeX (A) a LeX (B) epitop vznikají připojením fukózového zbytku k N-acetylglukosaminu ramene komplexního glykanu. U sLeX je připojena koncová kyselina sialová. V případě LeY (C) epitopu nese rameno komplexního glykanu dva fukózové zbytky připojené k N-acetylglukosaminu a galaktóze ramene.

Poly-N-acetylglukosaminy vznikají vlivem změny exprese  $\beta$ 1,4-galaktosyltransferázy ( $\beta$ 4GalT) a  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferázy ( $\beta$ 3GnT) a jde o opakující se disacharid složený z galaktózy a N-acetylglukosaminu tvořící prodloužené rameno komplexního glykanu<sup>19</sup>.



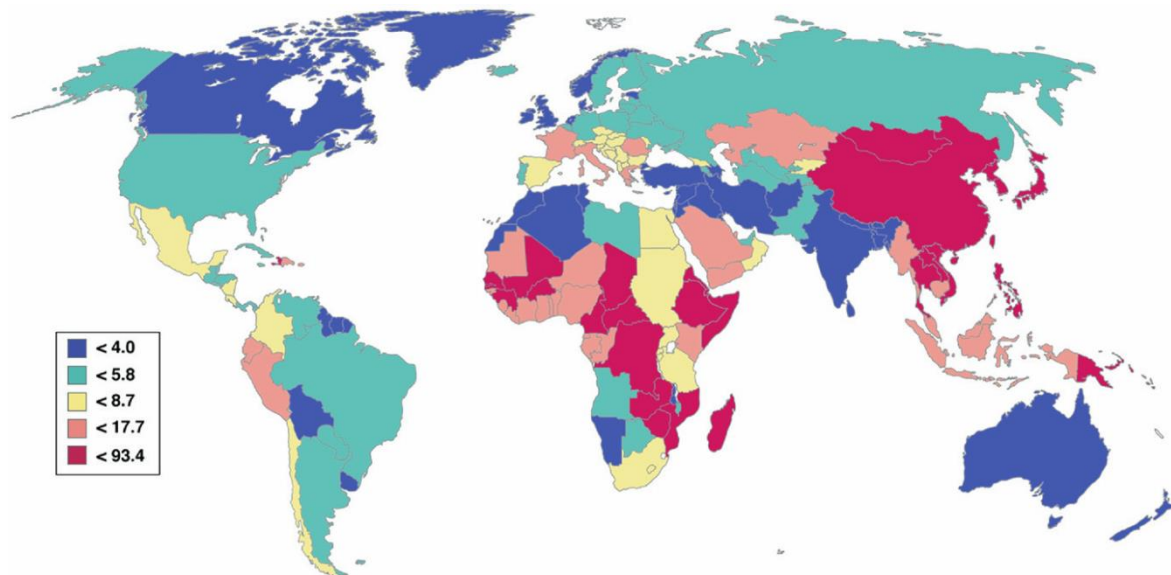
**Obrázek 6** Hlavními změnami glykanové struktury vlivem rakovinného bujení jsou připojení fukózy na N-acetylglukosamin jádra (A) nebo ramene (B) komplexního N-glykanu a tvorba poly-N-acetylglukosaminů (C). Glykany jsou zobrazeny s vyznačenými vazbami.

## 2.3 Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je pátým nejčastějším a třetím nejfatálnějším onemocněním<sup>20</sup>. Jedná se o typ rakoviny jater, který se vyskytuje více u mužů, než u žen především ve věku 50 let a více. Raná stadia HCC jsou léčena chirurgicky. Transplantace jater je řešením jak pro cirhotická, tak pro rakovinou napadená játra a minimalizuje riziko návratu nemoci. Vhodný pacient pro transplantaci musí splňovat takzvaná Milánská kritéria, tj. musí mít jedno nádorové ložisko o velikosti do 5 cm nebo maximální počet tří lézí menších než 3 cm. V takovém případě jsou šance pro přežití až 75 % a riziko návratu nemoci je menší než 15 %. V současné době neexistují vhodné biomarkery, pro včasnou diagnózu nemoci<sup>21</sup>. V procesu transplantace je používán i tzv. Model pro konečné stádium



onemocnění jater (MELD), což je bodovací systém pro posouzení závažnosti onemocnění pacienta. Podle skóre je pacientovi přidělena priorita na čekací listině pro transplantaci. Toto skóre je spojeno s velikostí nádoru, jeho agresivitou a celkovým stavem pacienta<sup>22</sup>. Diagnóza v pozdním stádiu rakoviny znamená pro nemocného řádově pár měsíců života.



**Obrázek 7** Mapa regionálních rozdílů v úmrtnosti z důvodu HCC. Výsledky jsou vztaženy na 100 000 obyvatel<sup>20</sup>.

Rakovině předchází typická série chronických onemocnění, mezi která patří hepatitida typu B (HBV) nebo C (HCV) a cirhóza jater. Cirhóza je považována za nejčastější rizikový faktor vzniku HCC a to i bez přítomnosti HBV nebo HCV<sup>22</sup>. HBV a HCV jsou ovšem jedním z katalyzátorů cirhózy spolu s nadužíváním alkoholu, autoimunitními onemocněními jater, chronickými záněty jater a hemochromatózou neboli předávkováním organismu železem. Pacienti s HBV a HCV jsou vysoce rizikovou skupinou pro vznik rakoviny jater i v případě, že se u nich onemocnění nevyvine v cirhózu<sup>20,22,23</sup>.

Sledování HCC je doporučeno a prováděno u rizikových pacientů pomocí  $\alpha$ -fetoproteinu a břišního ultrazvuku. Ultrazvukové vyšetření je obtížně proveditelné u pacientů s cirhózou jater, protože zjizvená tkáň zabrání detekovat rakovinné bujení. V případě  $\alpha$ -fetoproteinu je sledována jak jeho zvýšená exprese tak glykoforma L3<sup>24</sup>. Zvýšení exprese proteinu pozorujeme i u pacientů s HCV a u jiných onemocnění jater bez rakovinného bujení. Jde tedy o marker nedostatečně specifický a citlivý<sup>22</sup>.

Standardem používaným ke stanovení diagnózy v případě pozitivního nálezu je biopsie jater a magnetická rezonance (MRI). Biopsie jater je invazivní metoda, při níž může dojít ke komplikacím, jako jsou krvácení a záněty. MRI je stejně jako břišní ultrazvuk závislé na

velikosti lézí a stavu jater. Tkáň zjizvená cirhózou představuje problém v případě obou metod.

### 2.3.1 $\alpha$ -fetoprotein-L3

$\alpha$ -fetoprotein je jeden z hlavních proteinů krevní plazmy. Jedná se o N-glykoprotein o velikosti 591 aminokyselin s jedním glykosylačním místem na Asn251, které je obsazeno komplexním glykanem<sup>24</sup>. Produkce fetoproteinu je zajištěna žloutkovým váčkem a játry během fetálního vývoje. V tomto období váže ionty kovů, mastné kyseliny a bilirubin. V těhotenství je jeho zvýšená hladina využívána jako biomarker vývojových odchylek a abnormalit plodu<sup>25</sup>.

Glykosylovaná forma  $\alpha$ -fetoproteinu,  $\alpha$ -fetoprotein-L3, je využívaným biomarkerem pro diagnózu hepatocelulárního karcinomu u dospělých jedinců. Ve spojení s onemocněními se vyskytují 3 glykoformy tohoto proteinu, které se liší afinitou k lektinu *Lens culinaris agglutinin* (LCA)<sup>24</sup>. LCA je lektin vázající fukózu připojenou k jádru glykanu vazbou  $\alpha$ 1-6. Glykoforma  $\alpha$ -fetoprotein-L3 je lektin vázající a je specifická pro hepatocelulární karcinom. K detekci se používají dvě další specifické protilátky. Citlivost testu není dostatečná pro zachycení raných stádií nemoci a je ovlivněna velikostí nádoru. Částečnou afinitu k LCA lektinu má také  $\alpha$ -fetoprotein-L2, jehož koncentrace se zvyšuje v těhotenství a u nádorů žloutkového váčku. Glykoforma  $\alpha$ -fetoprotein-L2 snižuje specifitu  $\alpha$ -fetoproteinu jako biomarkeru pro HCC.

Řešením nízké specifity a citlivosti detekce HCC a zároveň neinvazivní diagnostickou metodou by mohla být kombinace více glykoproteinových markerů<sup>1,11,24</sup>.

## 2.4 Haptoglobin

### 2.4.1 Funkce

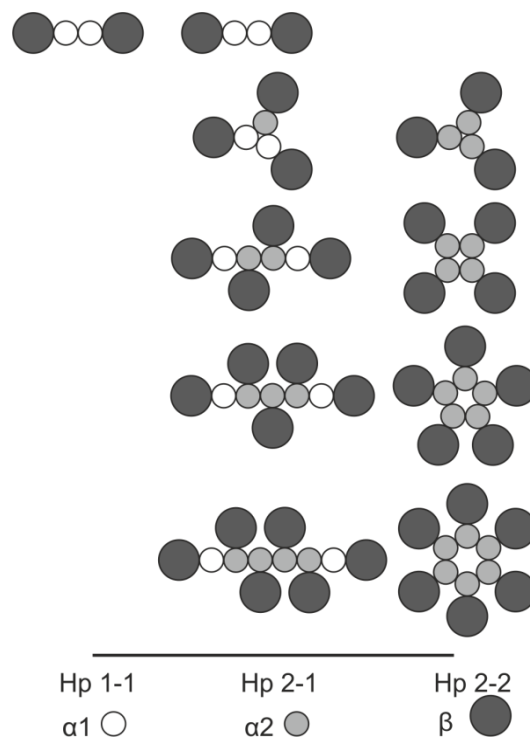
Haptoglobin (Hp) je jeden z velice důležitých proteinů hojně se vyskytujících v krevní plazmě. Hp je silný antioxidant, který se řadí do rodiny proteinů akutní fáze. Mezi proteiny akutní fáze patří jakýkoli protein, jehož koncentrace stoupá během zánětu. Jeho hlavní funkcí je vazba hemoglobinu (Hb) během intravaskulární hemolýzy neboli rozpadu červených krvinek. Během hemolýzy se obsah červených krvinek uvolní do krevního řečiště. Železo obsažené v hemu se podílí na Fentonově reakci, která produkuje reaktivní formy kyslíku. Ty jsou pro tělo velice toxické a způsobují poškození jater<sup>26,27</sup>. Hp má velice vysokou afinitu ( $K_d = 10^{-12}$  M) pro vazbu na hemoglobin a zabraňuje pohybu volného hemoglobinu v krevním řečišti jeho vyvazováním. Komplex Hp-Hb je tvořen

v plazmě a posléze transportován do retikulo-endoteliálního systému receptorem zprostředkovanou endocytózou. CD163 je specifický receptor pro komplex Hp-Hb nacházející se na povrchu makrofágů, ale také na hepatocytech a buňkách hepatocelulárního karcinomu<sup>28</sup>. Po transportu do místa určení jsou pak jednotlivé složky komplexu Hp-Hb degradovány<sup>29</sup>.

#### 2.4.2 Struktura

Gen pro Hp nacházející se na chromozomu 16q22 má 3 strukturní alely: Hp1F, Hp1S a Hp2. Polypeptid vzniklý translací Hp1F a Hp1S se liší pouze v jedné aminokyselině. Jedná se o záměnu Lys54 řetězce Hp1S za Glu na řetězci Hp1F<sup>30</sup>. Hp2 vznikl pravděpodobně spojením těchto dvou řetězců. Tato alela je přítomná pouze u lidí.

Hp je složený ze dvou  $\alpha/\beta$  monomerů kovalentně spojených za pomoci cysteinu 15, který se nachází na  $\alpha$  řetězci. Tyto  $\alpha/\beta$  řetězce jsou syntetizovány jako jeden, posléze jsou štěpeny na N-koncový  $\alpha$  (lehký) řetězec a C-koncový  $\beta$  (těžký) řetězec a propojeny pomocí cysteinů 31 a 248. Přítomnost různých alel je příčinou vzniku několika možných forem. Jedná se buď o homodimer Hp 1-1 nebo



**Obrázek 8** Fenotypy haptoglobinu (1-1, 2-1, a 2-2) a jejich skládání do multimerů. Upraveno podle<sup>30</sup>.

hetero-oligomer Hp 2-1 a oligomer Hp 2-2. Hp 1-1 dimer obsahuje dva stejné  $\alpha 1$  řetězce. Hp 2-2 oligomer, obsahuje stejné řetězce  $\alpha 2$ . Tvorba multimerů v případě forem Hp 2-1 a Hp 2-2 (Obrázek 7) je možná díky dvěma volným cysteinům (Cys15 a 74), přítomným na řetězci Hp2<sup>31</sup>. Těžký řetězec vykazuje vysokou homologii s katalytickou částí serinových proteáz s výjimkou konzervovaných histidinových a serinových aminokyselinových zbytků aktivního centra<sup>32</sup>.

#### 2.4.3 Změny glykosylace Hp vlivem onemocnění

Haptoglobin má čtyři N-glykosylační místa vyskytující se na Asn84, 207, 211 a 241. Jednotlivé sacharidové struktury jsou dobře charakterizovány<sup>33,34</sup>. Molekula haptoglobinu je nejčastěji modifikována komplexním biantennárním N-glykanem se dvěma koncovými

sialovými kyselinami vázanými vazbou  $\alpha$ 2-6 na galaktózy. Kromě biantennárního komplexního glykanu se na molekule haptoglobinu vyskytují také větvené triantenární a tetraantenární glykanové struktury, které mohou být navíc fukosylovány.

Tyto glykoformy se oproti biantennární formě vyskytují minoritně, avšak jejich koncentrace stoupá ve spojení s některými onemocněními<sup>29-35</sup>.

Exprese Hp není konstantní a velice se liší pod vlivy různých onemocnění. Důležitou roli hraje také fakt, že Hp se vyskytuje ve třech výše popsáných izoformách, které se mezi sebou liší svou hladinou v krvi a distribucí jednotlivých glykoforem.

Změny v distribuci glykoforem jsou nejvýraznější v případě izoform schopných tvořit multimery. Ve všech případech je nejhojnější glykoformou biantennární komplexní N-glykan, který se liší v počtu připojených kyselin sialových. Pro izoformu Hp 2-2 je nejzastoupenější glykoformou biantennární N-glykan s jednou kyselinou sialovou. Se zvyšující se multimerizací se zvyšuje i dominance této glykoformy. V případě izoform Hp 1-1 a 2-1 je hlavní glykoformou biantennární N-glykan se dvěma kyselinami sialovými. V případě, že se jedná o vyšší multimer izoformy Hp 2-1 je poměr glykanu s jednou a dvěma kyselinami sialovými nakloněn ve prospěch glykoformy s jednou kyselinou sialovou<sup>42</sup>.

Fukosylace haptoglobinu se normálně vyskytuje na jádru i ramenech glykanu, ale u HCC je oproti zdravým jedincům nárůst LeX struktury ramene triantenárního glykanu. Totéž lze pozorovat u pacientů s cirhózou jater. Celkově byla zaznamenána zvýšená fukosylace<sup>43</sup> u pacientů s cirhózou a HCC. U pacientů s HCC byl pozorován nárůst koncentrace Hp v séru oproti zdravým jedincům. Také byla pozorována zvýšená koncentrace glykanů nesoucích  $\alpha$ 1-6 vázanou fukózu a  $\alpha$ 2-6 vázanou kyselinu sialovou<sup>35,37</sup>.

Tyto změny v glykosylaci korelují se změnami v aktivitě enzymů  $\alpha$ 1-6 fukosyltransferázy ( $\alpha$ 1-6FUT) a sialyltransferázy připojující kyselinu sialovou vazbou  $\alpha$ 2-6 na galaktózu<sup>35</sup>.

Byl popsán také zvýšený výskyt větvených triantenárních a tetraantenárních glykanů s mnohačetnou fukosylací a sialylací. V některých případech byly pozorovány tetraantenární struktury až se šesti fukózovými monosacharidy tvořící různé glykanové epitopy jako například LeX, LeY, SLeX (Obrázek 5)<sup>36</sup>.

## 2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS – z anglického mass spectrometry) se řadí mezi velice citlivé, specifické a rychlé metody používané pro měření hmotnosti rozličných látek. Ve spojení s měkkými ionizačními technikami jako jsou ionizace/desorpce laserem za asistence matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI) má široké využití v glykomice jako nástroj pro analýzu glykokonjugátů. Výhodou je možnost přímého propojení se separačními metodami, jako je vysokotlaká kapalinová chromatografie HPLC<sup>44,45,46,47</sup> nebo kapilární elektroforéza (CE)<sup>48,49</sup>.

### 2.5.1 Studium glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (glykomika/glykoproteomika)

Dvěma hlavními přístupy využívanými pro studium glykoproteinů v kombinaci s hmotnostní spektrometrií jsou analýza oddělených glykanů a analýza glykopeptidů. Oddělení glykanů z proteinu je prováděno buď chemicky nebo enzymaticky. Chemické oddělení je složitý proces, kdy v konečné fázi dojde k hydrazinolýze glykanů<sup>50</sup> nebo jejich alkalické  $\beta$ -eliminaci<sup>49</sup>. Častěji využívanou metodou je enzymatické oddělení glykanů pomocí komerčně dostupných glykosidáz. Nejpoužívanějším enzymem je PNGáza F (z anglického peptide N-glycosidase F<sup>49</sup>). Tato endoglykosidáza štěpí vazbu mezi N-acetylglukosaminem a asparaginem, čímž oddělí celý glykan a zároveň dojde ke konverzi asparaginu na kyselinu asparagovou. Změny asparaginu na kyselinu asparagovou a zároveň změny molekulové hmotnosti peptidu po odštěpení glykanu se využívá k určení glykosylačního místa. K analýze samotných oddělených glykanů je často využívána permethylace, při níž dochází k substituci volných hydroxylových skupin glykanu za methylové skupiny za vzniku methyl etherů. Labilní karboxylové skupiny kyseliny sialové jsou stabilizovány methyl esterifikací. Permethylace slouží nejen ke stabilizaci volných glykanů, ale také umožňuje v kombinaci s fragmentačními technikami hmotnostní spektrometrie částečně určit jejich strukturu<sup>51</sup>.

Na druhé straně, analýza glykopeptidů umožňuje přiřadit jednotlivé glykany k příslušnému glykosylačnímu místu v proteinu, avšak rozřešení struktury glykanové složky peptidu je velmi komplikované. Nejčastěji se pro vytvoření glykopeptidů používají specifické proteázy. Mezi nejpoužívanější patří serinová proteáza trypsin (EC 3.4.21.4), která vytváří peptidy štěpením na C-konci pozitivně nabitých aminokyselin argininu a lysinu<sup>52,53</sup>. Ačkoliv výše zmíněná metoda poskytuje komplexní informace o složení glykopeptidu, má řadu limitací. Jelikož se téměř u většiny glykopeptidů vyskytuje

tzv. glykanová mikroheterogenita, dochází jejím vlivem ke snižování intenzity signálu glykopeptidů v hmotnostním spektru z důvodu jeho distribuce přes jednotlivé glykoformy a zároveň tvorbou více nabitých iontů, které vznikají při procesu ionizace analytu pomocí elektrospreje. Částečným řešením tohoto problému je volba vhodné metody pro nabohacení buď jednotlivých glykoproteinů například ze složitých proteinových směsí nebo glykopeptidů vzniklých po digesci.

K tomuto účelu lze s výhodou využít lektinové afinitní chromatografie<sup>54</sup>, nabohacení na hydrazidových kuličkách<sup>50</sup> nebo kapalinové chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC)<sup>55</sup>.

### 2.5.2 Fragmentační metody

Pro detailní charakterizaci glykanové struktury a jejího umístění v peptidovém řetězci lze využít fragmentace glykanů nebo glykopeptidů přímo v hmotnostním spektrometru. Mezi nejběžněji používané fragmentační metody pro analýzu glykanů a glykopeptidů patří disociace elektronových záchytem (ECD), disociace elektronovým transportem (ETD) a kolizí indukovaná disociace (CID)<sup>47</sup>. První dvě metody jsou především používány pro identifikaci posttranslačně modifikovaných aminokyselin a fragmentaci peptidového řetězce. Metodou elektronového záchytu (ECD) jsou generovány redukované radikálové kladně nabitě ionty ozářením několikanásobně nabitých iontů analytu vzniklých po Coulombické explozi během ionizace elektrosprejem. Během záchytu elektronů dochází k fragmentaci N-Cα vazby peptidu a vzniká populace c a z iontů, které umožňují identifikovat příslušný peptid. Postranní modifikace peptidového řetězce, jako je glykosylace, zůstávají zachovány, ale může dojít k jejich oddělení od peptidu. ECD fragmentace je účinný nástroj pro studium O-glykosylovaných proteinů, kde v případě výskytu více serinů a threoninů v primární struktuře proteinu není umístění glykanu přesně známo. Principem ETD je přenos elektronu na analyt pomocí elektronového nosiče. V případě fragmentace pomocí transportu elektronů (ETD) dojde k disociaci elektronů díky transportu elektronů na analyt a následné fragmentaci vzniklých kationtů. Dochází opět k přerušení vazby mezi atomy N-Cα peptidové vazby a vzniku c a z populace iontů. Touto metodou získáme téměř výlučně fragmenty peptidu se zachovanou postranní modifikací. Odlišný způsob přenosu elektronu umožňuje spojení s různými typy hmotnostních spektrometrů. Pro oba typy fragmentace je nutná vyšší hustota náboje analytu (> 3+). Na druhé straně při CID fragmentaci je většina energie spotřebována na rozštěpení samotného glykanu<sup>47</sup>. Peptidové fragmenty (y a b) jsou ve spektru zastoupeny

velmi málo a ve většině případů neumožňují snadnou interpretaci peptidů především pomocí automatických programů. Kombinace obou přístupů se jeví jako ideální postup pro detailní charakterizaci glykopeptidů.

#### 2.5.2.1 *Kolizí indukovaná disociace (CID)*

V případě glykopeptidů poskytuje tato metoda převážně fragmenty glykanu a pouze stopová množství fragmentů peptidu. Kolizně indukovanou disociaci lze provádět jak v pozitivním, tak v negativním modu ionizace. K fragmentaci dochází po srážce molekuly plynu s iontem analytu, při které dochází ke zvýšení vnitřní energie a následné fragmentaci<sup>56</sup>.

Ve spojení s trojitým kvadrupólem (QQQ) a hmotnostním spektrometrem s iontově cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (FT-ICR) se jedná o nízko-energetické srážky v rozsahu energií 1-100 eV. U QQQ analyzátoru dochází ke kolizím v druhém kvadrupólu, který funguje jako kolizní cela. Kolizní cela je naplněna neutrálním plynem, nejčastěji dusíkem (N<sub>2</sub>) nebo argonem (Ar)<sup>57</sup>.

#### 2.5.3 **Zdroj iontů/ Ionizace elektrosprejem**

Při hmotnostně spektrometrické analýze glykopeptidů se nejčastěji používá ionizace elektrosprejem<sup>58</sup>, která patří mezi tzv. měkké ionizační techniky. Tato metoda využívá elektrickou energii k přenosu iontů z roztoku do plynné fáze. Analyt ve vhodném organickém rozpouštědle je veden ohřátou kapilárou s vloženým napětím (2,5-6,0 kV), čímž je mu předán náboj stejné polarity, jaké je vložené napětí. Jako rozpouštědla jsou nejčastěji používána metanol a acetonitril ve vhodném poměru s vodou. Ke snížení velikosti kapének jsou k roztoku přidávány sloučeniny zvyšující vodivost. Příkladem je kyselina octová. Rozptýlením analytu je tvořen aerosol, který je vysoušen proudem ohřátého dusíku. Nabité kapičky generované při východu z kapiláry jsou unášeny ve směru gradientu tlaku a elektrického potenciálu směrem ke vstupu do analyzátoru hmotnostního spektrometru. Odpařování rozpouštědla způsobí zmenšování povrchu kapiček s analytem a repulzí náboje dojde ke Coulombické explozi a vzniku menších, stabilnějších kapiček. Tímto způsobem vznikají mnohonásobně nabitě pseudoionty. Díky vícenásobnému nabití analytu lze snadno rozšířit dynamický hmotnostní rozsah a analyzovat látky o velkých molekulových hmotnostech jakými jsou například glykopeptidy, ale i proteiny nebo proteinové komplexy<sup>59,60</sup>.

#### 2.5.4 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory jsou části hmotnostního spektrometru, kde dochází k dělení iontů na základě jejich poměru hmoty ku náboji označované jako  $m/z$ . Analyzátory se dělí podle toho, jestli využívají magnetické nebo elektrické pole, a jestli je dané pole statické nebo dynamické. Důležitými charakteristikami hmotnostních analyzátorů jsou rozlišení, přesnost a rozsah  $m/z$ , které lze daným analyzátozem měřit. Rozlišení analyzátoru je schopnost odlišit dvě molekuly o velice podobném  $m/z$  a přesnost je poměr měřeného  $m/z$  ku  $m/z$  skutečnému a většinou je udávána v jednotkách ppm<sup>61</sup>. Existuje šest hlavních hmotnostních analyzátorů. Princip kvadrupólového hmotnostního analyzátoru a iontově cyklotronové rezonance je popsán v následující kapitole.

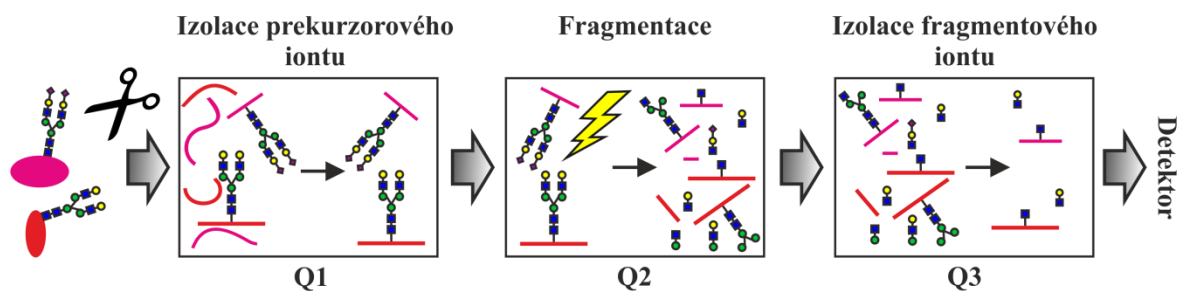
##### 2.5.4.1 Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř paralelních kovových tyčí, umístěných do rohů čtverce. Jejich odstup je stejný a neměnný. Úhlopříčné tyče jsou propojeny a střídavě je na ně veden stejnosměrný a střídavý proud. Výsledné elektrické pole způsobí, že ionty jsou vedeny napříč tyčemi v ose  $z$ , a po své cestě vykonávají kmitavý pohyb v rovině  $x-y$ . Ionty se pohybují na základě svého poměru  $m/z$ . Amplituda oscilace iontu je úzce spjata s jeho poměrem  $m/z$  a pohyb iontů je kontrolován změnami v nastavení frekvence střídání stejnosměrného proudu. Stejný směr proud a radiová frekvence mohou být nastaveny tak, aby amplituda oscilace odpovídala požadovanému  $m/z$  a vedla tento iont k detektoru. Ostatní ionty s nevyhovujícími amplitudami jsou vedeny k tyčím, kde jsou neutralizovány a k detektoru se nedostanou<sup>60</sup>.

##### 2.5.4.2 Trojitý kvadrupólový analyzátor (QQQ)

U QQQ analyzátoru jsou tři kvadrupólové analyzátory uspořádány lineárně za sebou (Obrázek 9). Analyzovaný iont, často zvaný prekurzor, je vybírán v prvním kvadrupólu (Q1). Druhý kvadrupól (Q2) je využíván jako kolizní cela. Prekurzorový iont je zde fragmentován srážkami s kolizním plynem, nejčastěji argonem. Unikátní fragmenty, nazývané též přechody, jsou vybrány a sledovány pomocí třetího kvadrupólového analyzátoru (Q3).

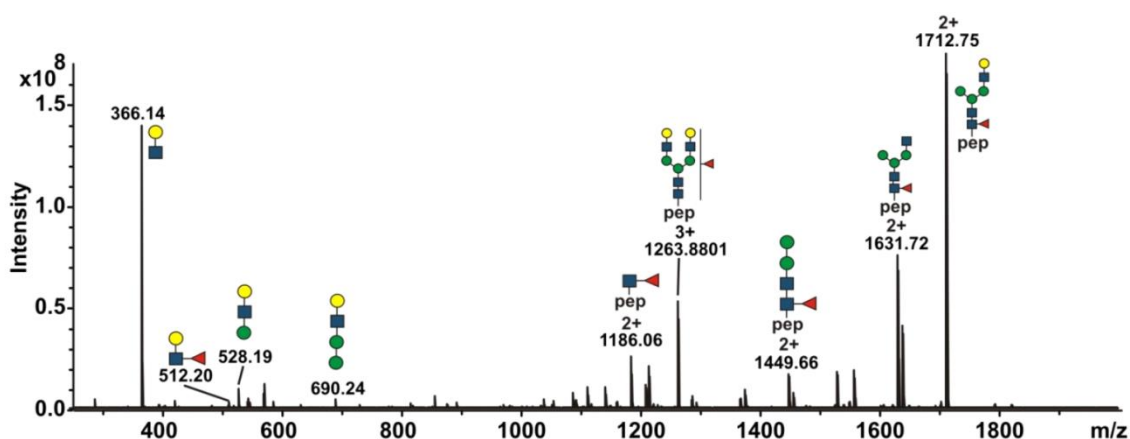




**Obrázek 9** Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru v módu *multiple reaction monitoring* (MRM). V prvním kvadrupólu (Q1) jsou separovány vybrané precursorové ionty. Druhý kvadrupól (Q2) slouží jako fragmentační cela a precursorové ionty jsou zde fragmentovány například kolizí indukovanou disociací (CID) a poslední kvadrupól (Q3) slouží opět jako hmotnostní filtr, tentokrát pro vybrané fragmentové ionty, tedy přechody, které jsou dále posílány na detektor. Upraveno podle<sup>25</sup>.

Tandemový kvadrupólový systém je využíván v několika skenovacích modech. Nejpoužívanější z nich je tzv. *product ion scan* (sledování fragmentových iontů) při kterém je v prvním kvadrupólu (Q1) vybrán specifický precursor o příslušném  $m/z$  a posléze je v druhém kvadrupólu (Q2) fragmentován a produktové ionty jsou skenovány a analyzovány ve třetím kvadrupólu (Q3). Tento mód je využíván například pro zjišťování aminokyselinové sekvence peptidů a proteinů. Druhým módem je *precursor ion scan*, kdy druhý kvadrupól (Q2) je nastaven k selekci určitého produktového iontu, který vybere ze vzniklých fragmentů iontu precursorového. Další možností je metoda *neutral loss scan*, kdy je detekována ztráta části analytu o určitém  $m/z$ . Tedy oba analyzátoři (Q1, Q3) jsou nastaveny na společné skenování konstantního rozdílu v poměru  $m/z$ . Posledním módem je *multiple reaction monitoring*, kdy oba analyzátoři (Q1, Q3) jsou statické pro páry precursorového iontu a jeho specifických produktových iontů<sup>57,59</sup>.

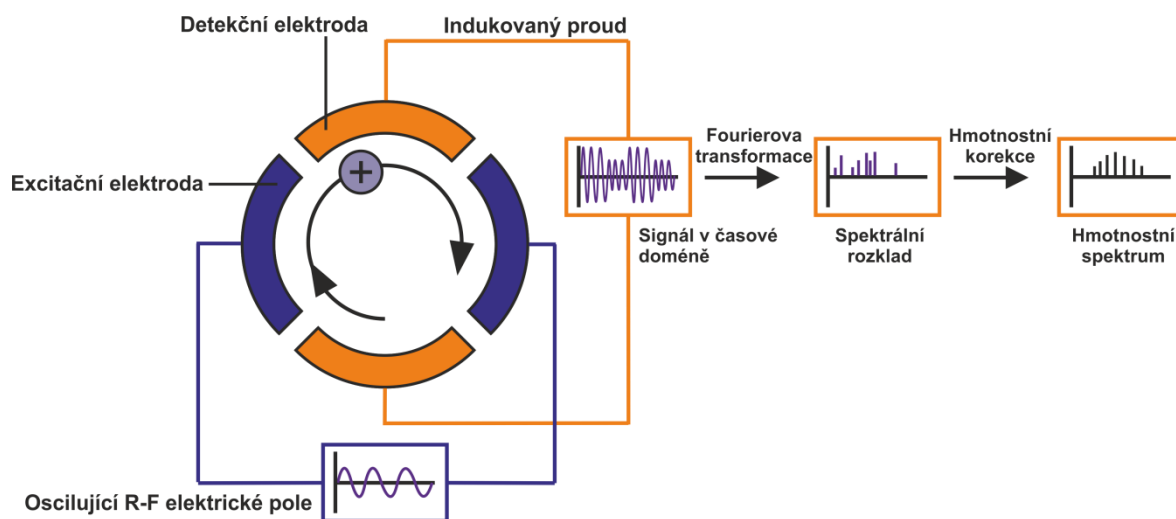
Kolizí indukovaná disociace glykopeptidů vytváří charakteristický profil fragmentačního spektra (Obrázek 10). Spektrum ukazuje vznik oxoniových iontů, fragmentů glykanu, vznikajících při CID fragmentaci glykopeptidů. Pro komplexní glykany jsou typické jedenkrát nabitě produktové ionty o  $m/z$  204 odpovídající molekule N-acetylglukosaminu (GlcNAc), dále potom ionty o  $m/z$  366 (GlcNAc-galaktóza),  $m/z$  657 (GlcNAc-galaktóza-kys. sialová) a další. Přítomnost oxoniových iontů ve fragmentačním spektru funguje jako značka pro glykopeptid, který je dobře rozpoznán od ostatních peptidů. V pravé části spektra jsou fragmenty peptidu se stále vázanou glykanovou složkou o různém počtu monosacharidových jednotek. Peptidový řetězec během kolizí indukované disociace fragmentuje neochotně a intenzity produktových iontů bývají malé.



**Obrázek 10** Fragmentační spektrum glykopeptidu vzniklé kolizí indukovanou disociací. Barevně jsou znázorněny fragmenty glykopeptidu patřící k příslušným  $m/z$ .

### 2.5.5 Analyzátor s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (FT-ICR)

Tento typ analyzátoru selektuje nabitě částice na základě jejich cyklotronové frekvence v uniformním magnetickém poli v závislosti na jejich poměru  $m/z$  (Obrázek 11). Ionty jsou po vstupu do iontové cyklotronové cely vybuzeny radiofrekvenčním napětím ke kruhovému pohybu, v rovině kolmé k magnetickému poli.



**Obrázek 11** Schéma analyzátoru s iontově cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací.

Frekvence, se kterou ionty rotují, je závislá na jejich poměru  $m/z$ . Všechny ionty se stejným  $m/z$  rotují se stejnou frekvencí. Tato frekvence není závislá na rychlosti iontů.

Pro detekci signálu je nutná excitace iontů. Excitace je docílena aplikací rovnoměrného elektrického pole, kolmého ke směru magnetického pole a rotujícího s cyklotronovou frekvencí iontů s požadovaným  $m/z$ . Tyto pulzy vybudí ionty k pohybu po kružnicích s větším poloměrem. Excitační frekvence vybudí pouze ionty s takovým  $m/z$  a frekvencí, která odpovídá frekvenci excitační. K tomuto slouží excitační desky. Pohyb iontů je zaznamenáván deskami detekčními, které jsou umístěny mezi deskami excitačními. Frekvence iontů odpovídá budící cyklotronové frekvenci a intenzita odpovídá množství vybuzených iontů. Detekční signál lineárně stoupá spolu s iontovým nábojem, iontová cyklotronová rezonance je tedy citlivější pro několikanásobně nabitě ionty. S odebráním excitačních frekvence se vybuzené ionty vrátí na svou původní oběžnou dráhu neboli do „relaxovaného“ stavu<sup>62,63</sup>.

### 3 Cíle práce

Cílem této práce byla charakterizace změn glykosylace lidských sérových proteinů, především haptoglobinu u pacientů s různým nádorovým onemocněním pomocí dvou odlišných hmotnostně spektrometrických přístupů.

Jednotlivé cíle práce zahrnují:

- Izolaci molekuly haptoglobinu ze séra.
- Charakterizaci glykoforem izolovaného haptoglobinu ze spojených sér pacientů pomocí hmotnostní spektrometrie.
- Optimalizaci přípravy séra pro hmotnostně spektrometrickou analýzu.
- Kvantitativní analýzu glykoforem vybraných sérových proteinů pomocí MRM a FT-ICR hmotnostní spektrometrie.
- Vyhodnocení a statistické zpracování dat.

## 4 Materiál

### 4.1 Biologický materiál

Sérum pacientů ve studii bylo poskytnuto podle protokolu schváleného Georgetownskou Univerzitní Institucionální radou a radou Plzeňské Fakultní Nemocnice. Sérum pacientů s HCC/HCV/n=10 a kontrolní sérum/n=10 bylo poskytnuto Georgetownskou Univerzitou ve spolupráci s Georgetownskou Univerzitní Nemocnicí, Washington D. C., USA a séra pacientů s HCC/n=10, kolorektálním karcinomem/n=10 a kolorektálním karcinomem s metastázemi do jater/n=10 bylo poskytnuto Plzeňskou Fakultní Nemocnicí, České Republiky.

### 4.2 Použité chemikálie

32 % kyselina chlorovodíková	Fluka, DE
Acetonitril, Lichrosolv LC-MS čistota	Merck, DE
Amonium bikarbonát	Sigma, USA
APCI-L Low Concentration Tuning Mix	Agilent Technologies, USA
Bicinchoninic Acid Kit	Sigma, USA
Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4B	Sigma, USA
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, USA
Etanol, p.a.	Lachner, CZ
Glycin	Sigma, USA
GlycoBuffer 1	New England Biolabs, MA
Guanidin hydrochlorid, krystalizovaný prášek	Sigma, USA
Haptoglobin	Sigma, USA
Hemoglobin	Sigma, USA
Hovězí sérový albumin	Sigma, USA
Hydrogenuhlíčan sodný	Sigma, USA
Chlorid sodný	Sigma, USA
Isopropylalkohol (IPA)	Merck, DE
Jodoacetamid (JAA)	Sigma, USA
Kyselina mravenčí, LC MS čistota	Sigma, USA
Kyselina trifluoroctová LC MS čistota	Sigma, USA
Neuraminidáza	New England Biolabs, MA
Octan sodný	Sigma, USA
PBS, 1x	Bio-Rad, USA
Trypsin	Promega, USA
Voda, LC MS čistota	Merck, DE

### 4.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy	Mettler Toledo, CH
Automatické pipety	Eppendorf, DE
	Gilson, USA
Centrifuga stolní 5415R (úhlový rotor F45-24-11)	Eppendorf, DE
Centrifuga stolní, Minispin (úhlový rotor F45-12-11)	Eppendorf, DE
Centrifuga Z 233 MK2 (úhlový rotor 220.87 VO5/6)	Hermle, DE
Elektroda pH metro Biotrode	Hamilton, CH
Hlubokomrazicí box -80 °C C585-86	New Brunswick Scientific, USA
Hmotnostní spektrometr solariX XR 12T	Bruker Daltonics, DE
Hmotnostní spektrometr Qtrap 6500	ABSciex, USA
HPLC systém UltiMate® 3000	Thermo Scientific, USA
Chromatografická kolona Proswift RP-1S	Thermo Scientific, USA
Chrom. kolona Acclaim C18 PepMapTM 100 (0,1x150 mm) částice o průměru 3 µm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA
Chrom. kolona Acclaim C18 PepMapTM 100 (0,1x20 mm) částice o průměru 5 µm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA
Chrom. kolona Symmetry C18 (3 µm x 180 µm x 20 mm)	Waters Associates, MA
Chrom. kolona (BEH 300Å, 1.7 µm x 150 mm x 75 µm)	Waters Associates, MA
HPLC systém nanoAcquity	Waters Associates, MA
Chrom. kolona MicroTrap™ - peptidová	Michrom Bioresources, USA
Chrom. kolona MicroTrap™ - proteinová	Michrom Bioresources, USA
Mikrocentrifuga Spektrafuge 16M (úhlový rotor)	Labnet, USA
Mikrostríkačka 250 µl	Hamilton, USA
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
pH metr Φ200	Beckman, USA
Sonikační lázeň	Bandellin, DE
Termostat stolní	Grant, GB
UV-VIS spektrometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Vodní lázeň	Memert, DE
Vortex VELP	Scientifica, I

### 4.4 Seznam roztoků

#### Vazebný pufr

0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl ve vodě, pH 8.5

#### Neutralizační roztok

1M Tris-HCl ve vodě, pH 9

**Mobilní fáze A pro HPLC**

2 % acetonitril ve vodě, 0,08 % TFA

**Mobilní fáze B Pro HPLC**

98 % acetonitril ve vodě, 0,08 % TFA

**Ambic - proteinový pufr**

50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ve vodě, pH 7.8

**Roztoky pro odsolení**

0,1 % kyselina trifluoroctová ve vodě

60 % acetonitril (ACN) s 0,1 % TFA ve vodě

**Solvent A pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS čistota)**

2 % acetonitril, 0,4 % kyselina mravenčí ve vodě

**Solvent B pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS čistota)**

95 % acetonitril, 0,4 % kyselina mravenčí, 4,6 %  $\text{H}_2\text{O}$

## 4.5 Softwarové vybavení

CorelDRAW X4

Softonic International, S.A., ES

Data Analysis 4.2

Bruker Daltonics, DE

flexAnalysis

Bruker Daltonics, DE

GlycoWorkbench 2

EUROCarbDB, UK<sup>64</sup>

GPMAW 7.0

Lighthouse data, DE

MASCOT

Matrix Science, GB

mMass 5.4.1

mMass.org, CZ<sup>65</sup>

MultiQuant 2.0

ABSciex, USA

ProteinScape 3

Bruker Daltonics, DE

R 3.1.3

Bell Laboratories, USA

## 5 Experimentální metody

### 5.1 Analýza glykosylace molekuly haptoglobinu u pacientů s různými onemocněními

#### 5.1.1 Vzorky

Od každého onemocnění zahrnující hepatocelulární karcinom, kolorektální karcinom a kolorektální karcinom s metastázemi do jater byla připravena směsná séra smícháním stejného objemového množství deseti jednotlivých patientských vzorků. Stejným způsobem bylo připraveno i kontrolní směsné sérum. Směsná séra byla posléze zamražena na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.1.2 Izolace haptoglobinu ze směsného krevního séra

##### 5.1.2.1 Příprava afinitní matrice pro izolaci haptoglobinu

Pro izolaci haptoglobinu se s výhodou využívá jeho velmi silné interakce s molekulou hemoglobinu, který je imobilizován na aktivovanou CNBr Sepharosu 4B. Všechny promývací kroky byly prováděny odstředěním na centrifuze po dobu 2-3 minut při 700xg.

Jeden miligram lyofilizované Sepharosy 4B byl smíchán s 50 ml ledové 1mM kyseliny chlorovodíkové. Kyselina byla po 15 minutách stání odstraněna a následně byla CNBr Sepharosa 4B 4 x promyta 50 ml 1mM kyseliny chlorovodíkové. Aktivovaná CNBr Sepharosa 4B byla převedena do vazebného pufru o složení 0.1M  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5M NaCl, pH 8.5 a důkladně promyta tímto pufrem (1 x 50ml, 6 x 15ml). Po promytí bylo přidáno 33 mg lidského hemoglobinu (Sigma, H7379) v 10 ml vazebného pufru a za stálého míchání byla směs ponechána inkubovat přes noc při  $4^{\circ}\text{C}$ . CNBr Sepharosa 4B s vázaným hemoglobinem byla promyta vazebným pufrem (3 x 14ml) a následně bylo přidáno 10 ml 0,2M glycinu, pH 8 pro zablokování volných vazebných míst. Směs byla za stálého míchání ponechána inkubovat při  $4^{\circ}\text{C}$  po dobu dvou hodin. Poté byla CNBr Sepharosa opět promyta vazebným pufrem (5 x 14ml) a převedena do 6 ml PBS pufru. Takto připravená afinitní matrice byla uskladněna při  $4^{\circ}\text{C}$  pro další použití, ne déle než tři dny.

Pro jednu izolaci bylo odebráno 300  $\mu\text{l}$  matrice a třikrát promyto 500  $\mu\text{l}$  1xPBS. Sérum o objemu 170  $\mu\text{l}$  bylo zředěno 1xPBS na objem 500  $\mu\text{l}$ , smícháno s připravenou matricí a inkubováno po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla matrice promyta 5 x 500  $\mu\text{l}$  1xPBS. Navázaný haptoglobin byl eluován 4 x 300  $\mu\text{l}$  0.1M glycinu, pH 2.5 po



předešlé 5 minutové inkubaci. Všechny vzorky byly okamžitě neutralizovány přidáním 30  $\mu$ l 1M Tris-HCl, pH 9. Následně byl ke vzorkům přidán guanidin hydrochlorid do výsledné koncentrace 6M.

#### 5.1.2.2 *Purifikace haptoglobinu pomocí HPLC*

Pro získání čistého haptoglobinu bylo nutné jednotlivé vzorky po afinitním nabohacení dále separovat na koloně s obrácenou fází. Vzorky o objemu 300  $\mu$ l byly aplikovány pomocí manuálního nástřikového ventilu do vysokotlakého kapalinového chromatografu s UV detekcí, kde byly separovány na koloně Proswift RP-1S (Dionex) gradientem mobilní fáze 1-75 % B za 18 minut, průtokem 1ml/min, při teplotě kolony 40°C. Složení mobilních fází: B - 98 % acetonitril ve vodě, 0,08 %TFA; A - 2 % acetonitril ve vodě, 0,08 %TFA. Eluované proteiny byly sledovány při vlnové délce 214 nm a frakce obsahující haptoglobin byly manuálně sbírány a následně vysušeny pomocí zařízení SpeedVac.

#### 5.1.3 **Spektrofotometrické stanovení koncentrace haptoglobinu za pomoci kyseliny Bicinchoninové**

Byla připravena ředící řada BSA o koncentracích 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2 mg/ml v destilované vodě ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/ml. Poté byla smíchána reakční činidla v objemovém poměru 1:50 (roztok síranu měďnatého:BCA). Vysušené vzorky obsahující haptoglobin byly rozpuštěny v 0,5 ml 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pufru, 7.8. Ke 4  $\mu$ l vzorků izolovaného haptoglobinu a k jednotlivým standardům BSA o různých koncentracích bylo přidáno 80  $\mu$ l reakčního činidla roztoku síranu měďnatého s BCA v poměru 1:50.

Takto připravené vzorky byly ponechány inkubovat při 37°C po dobu 30 minut. Po uplynutí reakční doby byla na UV/VIS spektrofotometru DeNovix DS-11 změřena absorbance vzorků. Byla použita výrobcem zavedená metoda nazvaná „Protein BCA“, při které je měřena absorbance vzorků za použití vlnové délky 562 nm. Nejprve byla proměřena absorbance jednotlivých standardů BSA o známých koncentracích. Po sestavení kalibrační křivky, byly proměřovány vzorky obsahující haptoglobin. Všechna měření byla prováděna v triplicátech. Optická dráha byla přístrojem upravována na 1 mm a hodnoty koncentrace byly uvedeny v jednotkách mg/ml.

#### 5.1.4 Štěpení haptoglobinu trypsinem a odstranění sialových kyselin pomocí neuraminidasy

Bylo odebráno 5 µg haptoglobinu z každého vzorku a 5 µg komerčně dostupného haptoglobinového standardu bylo rozpuštěno ve 20 µl 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.8. Nejprve byla provedena redukce cysteinových můstků pomocí redukčního činidla dithiotreitolu (DTT) o výsledné koncentraci 10mM. Reakce byla ponechána inkubovat po dobu 45 minut při 60°C.

Po vychladnutí roztoku byla provedena alkylace redukováných cysteinů pomocí jodoacetamidu (JAA) o výsledné koncentraci 30mM. Po 30 minutové inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě byl přidán roztok redukčního činidla DTT o konečné koncentraci 50mM.

K takto připravenému roztoku haptoglobinu byl přidán 1 µl trypsinu o koncentraci 0,1 µg/µl a vzorek byl ponechán inkubovat přes noc při 37°C ve vodní lázni.

Štěpený haptoglobin byl odsolen pomocí zařízení MicroTrap obsahující mikrokolonu na bázi obrácené fáze. Po aplikaci směsi tryptických peptidů haptoglobinu na odsolovací kolonu a promytí 3 x 250 µl 0,1 % kyselinou trifluoroctovou ve vodě (TFA), byly peptidy eluovány 100 µl 60 % acetonitrilu (ACN) s 0,1 % TFA. Eluát byl posléze vysušen pomocí SpeedVac koncentrátoru. Pro odstranění kyseliny sialové byly vzorky rozpuštěny ve 20 µl GlycoBuffer 1 (New England Biolabs), do kterého bylo přidáno 100 jednotek neuraminidasy. Reakční směs byla inkubována 20 hodin při 37°C.

#### 5.1.5 Hmotnostně spektrometrická analýza

Dva mikro litry vzorku (0,8 µg) byly pomocí automatického dávkovacího zařízení aplikovány na odsolovací kolonu C18 column (Acclaim PepMap 100, 100 µm x 2 cm, Thermo Scientific) a promývány mobilní fází A o průtoku 10 ul/min po dobu 3 minut. Následně byly peptidy eluovány gradientem 2 – 45 % B po dobu 40 min při průtoku 0,5 ul/min (Tabulka 1) a separovány na analytické koloně s obrácenou fází C18 column (Acclaim PepMap RSLC, 75 µm x 15 cm, Thermo Scientific) zahřívanou na 60°C, která byla přímo spojena s iontovým zdrojem (Captive Spray, Bruker Daltonics) hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou (solariX XR, Bruker Daltonics). Hmotnostní spektrometr pracoval v tzv. přehledovém módu (z anglického „precursor survey scan“) bez fragmentací mateřských iontů. Data byla sbírána s 1 megabitovou akvizicí s akumulací iontů 0,4 s. Vždy čtyři spektra byla průměrována a uložena. Jako interní standart byl použit roztok APCI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies, USA) aplikovaný

do filtru nano elektrospreje. Interní kalibrace probíhala automaticky pomocí iontů o  $m/z$  622.0289 a 922.0097. Pro ověření některých glykopeptidů byl hmotnostní spektrometr nastaven do režimu umožňující kolizně indukovanou disociaci mateřských iontů. Získaná data byla zpracována pomocí komerčního programu Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics) a manuálně vyhodnocena.

**Tabulka 1** Zastoupení mobilní fáze B během separace peptidů na koloně s obrácenou fází.

Čas [min]	Mobilní fáze B [%]
4	2
43	45
46	95
49	95
50	2
60	2

## 5.2 Analýza sérových glykoproteinů jednotlivých patientských vzorků

### 5.2.1 Vzorky

**Tabulka 2** Etiologie a charakteristika pacientů jednotlivých onemocnění. Rasa: E-europoidní, N-negroidní, M-mongoloidní.

	Průměrný věk	Muž/žena	Rasa E/N/M	Cirhóza Ano/Ne	HCV Ano/Ne
<b>Kontrola</b>	57,1	8/2	6/4/0	-	-
<b>KR</b>	65,9	6/4	10/0/0	<b>0/10</b>	<b>0/10</b>
<b>KR+JM</b>	60	7/3	9/0/0	<b>1/9</b>	<b>1/9</b>
<b>HCC</b>	64	10/0	9/0/1	<b>4/6</b>	<b>0/10</b>
<b>HCC/HCV</b>	55,6	8/2	6/4/0	<b>10/0</b>	<b>10/0</b>

### 5.2.2 Deplece albuminu

Z každého vzorku séra bylo odebráno 10  $\mu$ l ke kterým bylo v mikrozkuhavce o objemu 0,5 ml přidáno 290  $\mu$ l destilované vody. Takto ředěné sérum bylo odstředěno po dobu 15 minut při 15 000 $\times$ g a teplotě 25°C. Následně bylo odebráno přibližně 150  $\mu$ l roztoku ode dna mikrozkuhavky tak, aby ve zkuhavce zůstala lipidová vrstva oddělena předešlým odstředěním. Roztok byl přenesen do nové mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml a bylo

přidáno 300 µl 150mM chloridu sodného (NaCl) a 350 µl ledového 100 % etanolu (konečná koncentrace ethanolu byla přibližně 42 %). Roztok byl inkubován po dobu 1 hodiny v lednici při 4°C. Následně byl roztok znovu odstředěn po dobu 45 minut při 16 000xg a 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována ve 200 µl ledového 42 % etanolu. Směs byla opět odstředěna po dobu 15 minut při 16 000xg a 4°C. Supernatant s rozpuštěným albuminem byl opět odstraněn a peleta obsahující sérové proteiny byla uschována na -20°C.

### **5.2.3 Příprava vzorků pro hmotnostně spektrometrickou analýzu**

Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích a následná příprava zahrnující redukci proteinů, modifikaci pomocí JAA a následné štěpení trypsinem byla prováděna stejným postupem uvedeným v kapitolách 5.1.4, s tím rozdílem, že polovina každého vzorku byla po štěpení trypsinem odebrána a inkubována s neuraminidázou za stejných podmínek uvedených výše. Celkově bylo tedy připraveno 100 vzorků (50 vzorků ošetřených neuraminidasou, 50 vzorků bez inkubace s neuraminidasou). Koncentrace proteinů byla u všech vzorků upravena na hodnotu 0,5 µg/µl.

### **5.2.4 Hmotnostně spektrometrická analýza pomocí FT-ICR**

Dva mikrolitry vzorku (1 µg) byly pomocí automatického dávkovacího zařízení aplikovány na odsolovací kolonu C18 column (Acclaim PepMap 100, 100 µm x 2 cm, Thermo Scientific) a promývány mobilní fází A o průtoku 10 µl/min po dobu tří minut. Následně byly peptidy eluovány gradientem 1 – 50 % B po dobu 20 min při průtoku 0,5 µl/min a separovány na analytické koloně s obrácenou fází C18 column (Acclaim PepMap RSLC, 75 µm x 15 cm, Thermo Scientific) zahřívanou na 60°C, která byla přímo spojena s iontovým zdrojem (Captive Spray, Bruker Daltonics) hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou (solariX XR, Bruker Daltonics). Hmotnostní spektrometr byl nastaven stejně jako je uvedeno v kapitole 5.1.5.

**Tabulka 3** Zastoupení mobilní fáze B během MRM a FT-ICR analýzy.

Čas [min]	Mobilní fáze B [%]
3	1
20	50
25	98
29,5	98
30	1
45	1

### 5.2.5 Hmotnostně spektrometrická analýza pomocí MRM

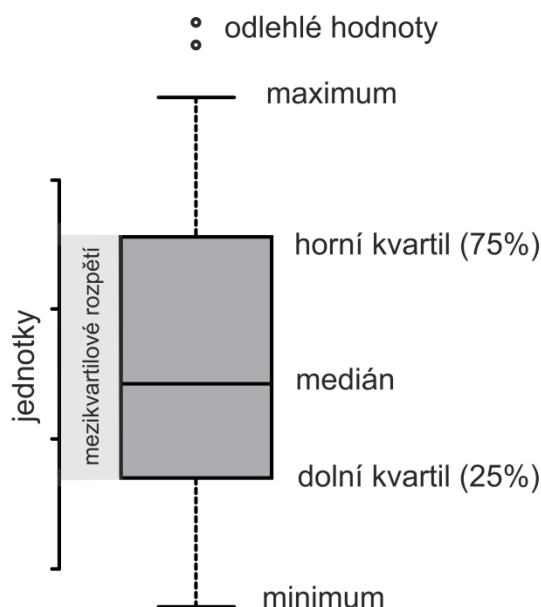
Tento typ hmotnostně spektrometrické analýzy byl proveden v partnerské laboratoři Radoslava Goldmana na Geortownské Univerzitě. Analýza vzorků probíhala následujícím způsobem.

Dva mikrolitry vzorku (1 µg) byly aplikovány na odsolovací kolonu Symmetry C18 (3 µm x 180 µm x 20 mm, Waters Associates, Milford, MA) a promývány mobilní fází A o průtoku 10 µl/min po dobu 3 minut. Peptidy byly separovány pomocí kapilární kolony (BEH 300Å, 1.7 µm x 150 mm x 75 µm, Waters Associates, Milford, MA) acetonitrilovým gradientem popsáným v Tabulce 3. Separační kolona byla přímo spojena s hmotnostním spektrometrem 6500 Q-TRAP (AB Sciex Framingham, MA). Kolizní energie pro každý oxoniový iont byly vypočítány pomocí následujících rovnic: pro oxoniový iont 204:  $y = 0.0349x + 14.877$  a pro oxoniový iont 366:  $y = 0.0688x - 37.825$  kde  $y$  představuje kolizní energii a  $x$  představuje  $m/z$  prekursoru<sup>66</sup>.

### 5.2.6 Vyhodnocení dat

MRM data byla zpracována pomocí programu MultiQuant 2.0 (AB Sciex, USA) a exportována do textových souborů pro další zpracování. Pro výpočet poměrů jednotlivých glykoform bylo využito intenzity oxoniového iontu  $m/z$  366. Data z MS/MS analýzy z hmotnostního spektrometru FT-ICR byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA), exportována do souboru mgf a prohledána pomocí Mascot/SwissProt databáze. MS data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA) a intenzity třetího izotopu glykopeptidů byly použity při výpočtech poměrů jednotlivých glykoform příslušných peptidů.

Data získaná pomocí MRM a FT-ICR byla zpracována v konečné fázi pomocí programu R (Bell Laboratories, USA). Nejprve byl aplikován Shapirův-Wilkův test normality na jednotlivé soubory dat. V našem případě se jednalo o kontrolní skupinu pacientů, dvě skupiny pacientů s hepatocelulárním karcinomem, jednu skupinu pacientů s kolorektálním karcinomem a o skupinu s kolorektálním karcinomem a metastázemi do jater. Nulovou hypotézou Shapirova-Wilkova testu je tvrzení, že vzorky  $x_1-x_n$  pocházejí z normálně distribuované populace, tedy že data mají normální rozdělení. Následně byl aplikován Kruskal-Wallisův test, který je vhodný pro menší soubory dat. Jedná se o neparametrický test porovnávající distribuce v jednotlivých souborech dat, tedy jestli se rozdělení hodnot v souborech liší. Výsledná data jsou zobrazena pomocí boxplotů (Obrázek 12). Boxplot je běžný způsob znázornění skupiny číselných hodnot pomocí kvartilů.



**Obrázek 12** Boxplot s popisky důležitých hodnot. Medián je číslice/hodnota oddělující horní a dolní polovinu hodnot. Horní a dolní kvartil znázorňuje medián ve 25 a 75 procentech. „Vousy“ boxplotu znázorňují minimální, respektive maximální hodnotu skupiny, mohou sahát pouze do vzdálenosti 1,5 násobku mezikvartilové vzdálenosti od horního i dolního kvartilu. Vše co je více, než 1,5 násobek je znázorněno jako odlehlá hodnota.

## 6 Výsledky

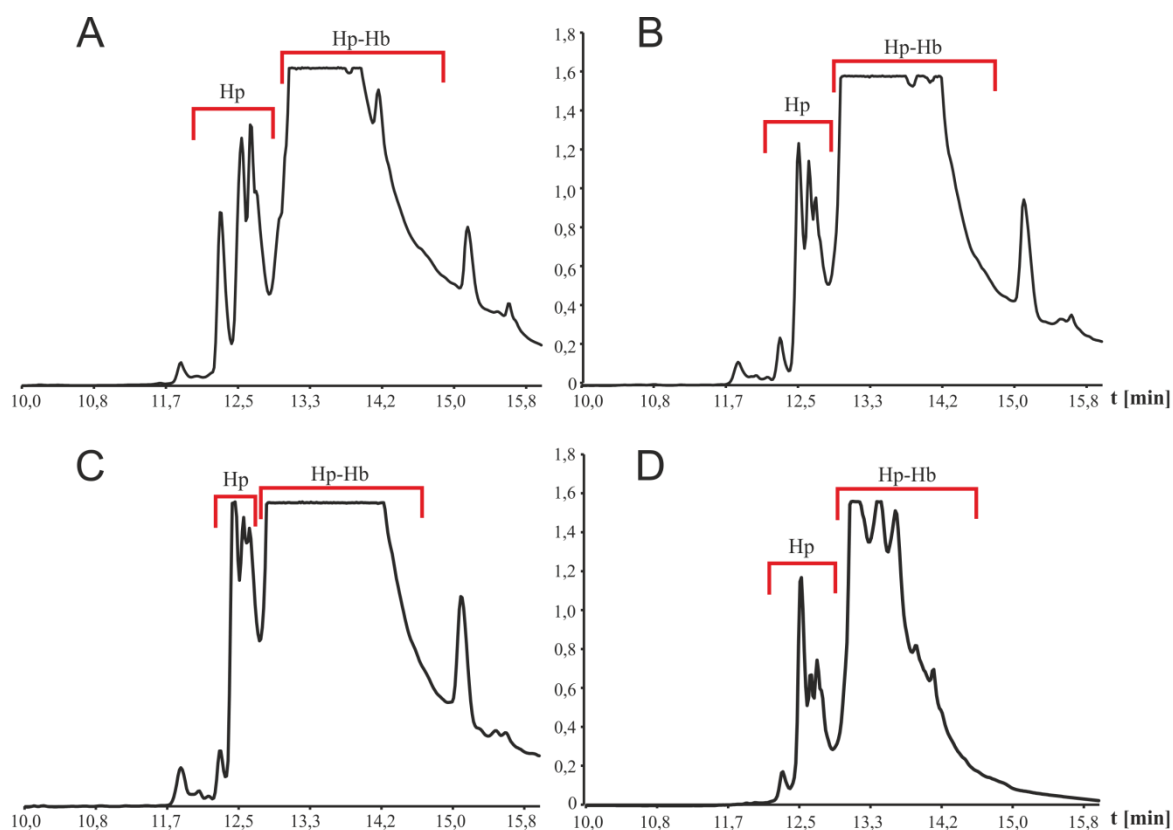
### 6.1 Analýza glykosylace molekuly haptoglobinu u pacientů s různými onemocněními

#### 6.1.1 Izolace haptoglobinu z krevního séra

Pro účely podrobné analýzy jednotlivých glykoform haptoglobinu pomocí hmotnostní spektrometrie bylo nejprve zapotřebí získat haptoglobin v dostatečném množství a čistotě. Haptoglobin byl nejprve nabohacen pomocí izolace na hemoglobinové koloně a po následném přečištění pomocí HPLC na obrácené fázi byl protein štěpen trypsinem a ošetřen neuraminidasou pro odstranění sialových kyselin. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí FT-ICR hmotnostní spektrometrie.

Jednotlivé chromatogramy na Obrázku 13 představují separaci molekuly haptoglobinu izolovaného ze směsných sér pacientů s hepatocelulárním karcinomem, kolorektálním karcinomem, kolorektálním karcinomem s jaterními metastázemi a z kontrolního séra. Haptoglobin se z kolony uvolňuje od 12 do 12,7 minuty. Ve 13. minutě se uvolňuje komplex haptoglobinu s hemoglobinem. Chromatografický vrchol objevující v čase kolem 15 minuty představuje apolipoprotein. Frakce s komplexem hemoglobin/haptoglobin a apolipoproteinem sbírány nebyly. Chromatografický vrchol eluce haptoglobinu má tři maxima způsobené přítomností jednotlivých fenotypů ve směsném séru. Vzorky, se kterými jsme pracovali, byly směsí deseti jednotlivých pacientů, a proto jsou v každém s velkou pravděpodobností zastoupeny všechny fenotypy haptoglobinu.

Metodou BCA podle protokolu 5.1.3 byla stanovena koncentrace haptoglobinu. Celkové množství získaného haptoglobinu ze 170  $\mu\text{L}$  kontrolního séra a séra pacientů s HCC bylo 17  $\mu\text{g}$ . Pro další analýzy bylo použito 5  $\mu\text{g}$  z každého vzorku. Vzorky byly dále zpracovány podle protokolu 5.1.4.

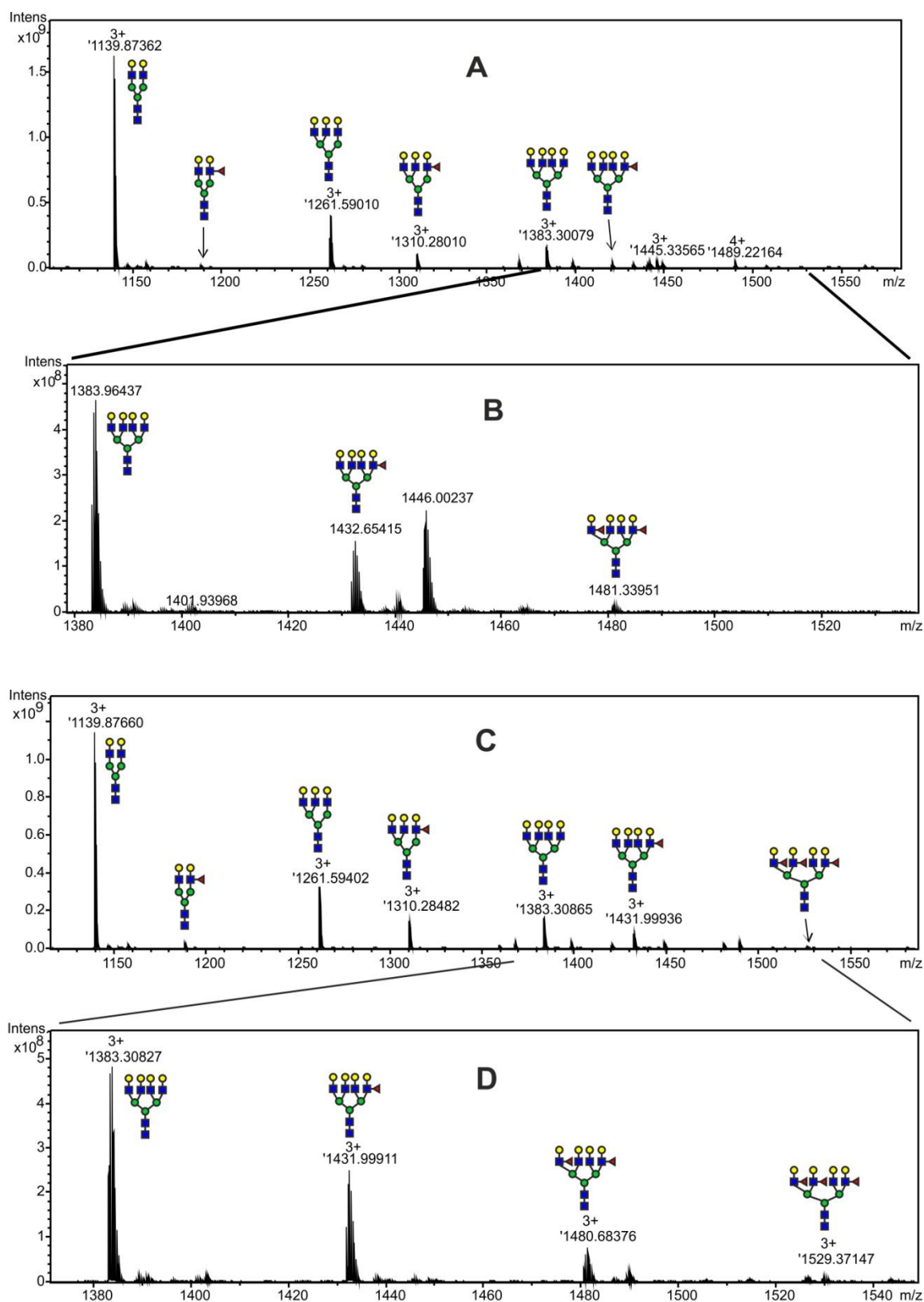


**Obrázek 13** Chromatogram izolace haptoglobinu kontrolní skupiny (A), pacientů s HCC (B), pacientů s kolorektálním karcinomem (C) a pacientů s kolorektálním karcinomem a metastázemi do jater (D). Na křivkách je vyznačena oblast eluce haptoglobinu (Hp) a oblast eluce komplexu haptoglobinu s hemoglobinem (Hp-Hb).

### 6.1.2 Hmotnostně spektrometrická analýza molekuly haptoglobinu pacientů s různými onemocněními

Pomocí hmotnostní spektrometrie byly identifikovány glykopeptidy haptoglobinu s jednotlivými glykanovými složkami. Nejlépe byly pozorovány glykoformy peptidu VVLHPNYSQVDIGLIK, označeného jako T3, nesoucí jeden glykosylační motiv. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda bude možné pomocí FT-ICR hmotnostní spektrometrie identifikovat a kvantifikovat jednotlivé glykoformy haptoglobinu. U kontrolního vzorku, (Obrázek 14) panely A, B, byly nalezeny glykoformy až se dvěma fukózami a čtyřmi rameny ( $m/z$  1481,3395) (B). Nejhojnější glykoformou byl biantennární ( $m/z$  1139,8736) a triantenární ( $m/z$  1261,5901) třikrát nabitý komplexní glykan (A). Méně intenzivní byly fukosylované bi- ( $m/z$  1188,5551), tri- ( $m/z$  1310,2801) a tetraantenární ( $m/z$  1432,6541) glykany a tetraantenární glykan bez fukózy ( $m/z$  1383,3007).





**Obrázek 14** A) Hmotnostní spektrum peptidu T3 (VVLHPNYSQVDIGLIK) haptoglobinu kontrolního séra. B) Detail hmotnostního spektra s víceraennými a glykoformami. C) Hmotnostní spektrum peptidu T3 (VVLHPNYSQVDIGLIK) haptoglobinu pacientů s HCC. D) Detail hmotnostního spektra s víceraennými glykoformami.

U vzorku pacientů s HCC (Obrázek 14) panely C a D byly nalezeny stejné glykoformy jako u kontrolního vzorku, avšak navíc byl identifikován tetraantenární glykan se třemi fukózami o  $m/z$  1529,3714.

## **6.2 Analýza sérových glykoproteinů jednotlivých patientských vzorků**

### **6.2.1 Etanolová deplece albuminu**

V druhé části experimentů bylo pracováno s jednotlivými vzorky pacientů. S větším počtem vzorků bylo nutné upravit způsob jejich přípravy pro MS analýzu tak, aby byla méně časově a finančně náročná. Metoda, kterou jsme pro tyto účely zvolili využívá etanol v konečné koncentraci 42 % pro precipitaci albuminu, který je v séru v nadbytku. Intenzity peptidů albuminu jsou během MS analýzy majoritní a potlačují ostatní méně zastoupené peptidy jiných proteinů. Po odstranění albuminu bylo možné pozorovat i méně zastoupené sérové proteiny a jejich peptidy. Hmotnostní spektra byla také méně komplexní, což usnadnilo interpretaci dat. Koncentrace sérových proteinů po etanolové depleci byla stanovena podle protokolu 5.1.3. Z každého vzorku bylo odebráno 10  $\mu$ g proteinů pro další použití. Proteinová směs částečně zbavená albuminu byla štěpena trypsinem a následně rozdělena do dvou skupin. K jedné skupině byl poté přidán enzym neuraminidáza podle protokolu 5.1.4. za účelem odštěpení sialových kyselin.

### **6.2.2 Hmotnostně spektrometrická analýza depletovaného séra**

Pomocí hmotnostně spektrometrické analýzy přístrojem solariX FT-ICR bylo identifikováno 64 proteinů krevního séra, z nichž bylo vybráno 15 nejhojnějších (Tabulka 4), jejichž glykopeptidy byly dále sledovány.

Pro MRM analýzu byl vytvořen seznam předpokládaných glykoform tryptických štěpů jednotlivých proteinů. Kolizně indukovaná disociace jednotlivých glykopeptidů poskytla typické oxoniové ionty  $m/z$  204 (N-acetylglukosamin/N-acetylgalaktosamin) a  $m/z$  366 (laktosamin). V případě MRM analýzy byly monitorovány jak oxoniové ionty (204 a 366, popřípadě 512), tak specifické fragmenty peptid-N-acetylglukosamin (N-glykopeptidy) a peptid-N-acetylgalaktosamin (O-glykopeptid). Pro správnou identifikaci příslušných píků byla využita také hodnota retenčního času, který se shodoval u všech přechodů pocházejících ze stejného glykopeptidu.

**Tabulka 4** Proteiny identifikované pomocí hmotnostně spektrometrické analýzy provedené na přístroji solariX FT-ICR. Vybrané glykopeptidy proteinů s hvězdičkou byly dále analyzovány a kvantifikovány pomocí MRM a FT-ICR.

	Identifikovaný protein	MW[kDa]	Peptidy
1	Sérový albumin	69,3	51
2	Serotransferrin*	77,0	34
3	Haptoglobin*	45,2	14
4	Komplement C3	187,0	29
5	Fibrinogen $\beta$ -řetězec	55,9	20
6	$\alpha$ -2-makroglobulin	163,2	17
7	Ig $\gamma$ I řetězec C	37,6	12
8	$\alpha$ -1-antitrypsin	46,7	11
9	Fibrinogen $\alpha$ -řetězec	94,9	20
10	Komplement faktor H*	139,0	13
11	Clusterin I*	53	5
12	Ig gamma III chain C	41,3	10
13	Ig alpha I chain C	37,6	12
14	Ig mu	49,3	9
15	Hemopexin*	51,6	6

Hodnoty plochy píků u každé glykoformy pro oxoniový iont 366 byly vypočteny pomocí programu MultiQuant 2.0. Správnost integrační plochy byla manuálně ověřena. Relativní kvantifikace byla provedena na základě poměrů plochy píků fukosylované versus nefukosylové glykoformy, eventuálně na základě poměrů dvakrát sialované versus jedenkrát sialované glykoformy.

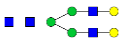





Stejně vzorky byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru 12T solariX XR FT-ICR. Glykopeptidy byly identifikovány s chybou < 1 ppm. Vybrané glykopeptidy byly validovány pomocí CID fragmentace. Kvantifikace jednotlivých glykoform byla provedena na základě poměrů intenzit třetích izotopů příslušných glykopeptidů. Třetí izotop byl zvolen z důvodu jeho nejvyšší intenzity oproti ostatním izotopům glykopeptidu.

Z 15 vybraných proteinů bylo možné pomocí FT-ICR a MRM hmotnostní spektrometrie kvantifikovat pouze glykopeptidy haptoglobinu, hemopexinu a komplement faktoru H. Glykopeptidy ostatních identifikovaných proteinů a jejich glykoformy neměly dostatečnou intenzitu pro kvantifikaci nebo nebyly nalezeny.

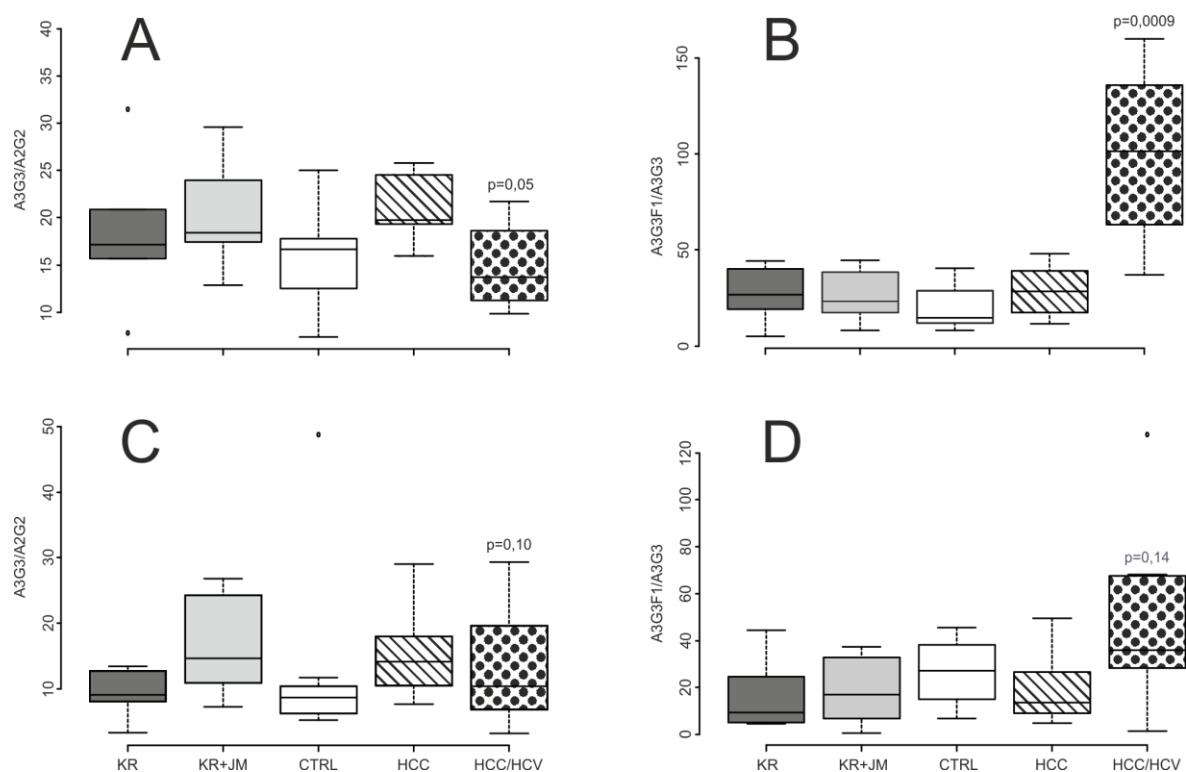
**Tabulka 5** Nalezené glykopeptidy a jejich glykoformy. Glykopeptidy označené hvězdičkou byly kvantifikovány.

Protein	Peptid	Glykan	m/z pozorovaná	m/z vypočítaná	Chyba (ppm)
Serotransferrin	CGLVPVLAENYNK	A2G2	1033.7833 (3+)	1033.7825 (3+)	0,7
	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR	A2G2	1379.9010 (3+)	1379.9067 (3+)	1
Hemopexin	SWPAVGNCSSALR*	A2G2	1514.12925 (2+)	1514.1289 (2+)	0,4
		A2G2F1	1587.15576 (2+)	1587.1578 (2+)	
		A3G3	1696.6958 (2+)	1696.6950 (2+)	0,5
	TLPPTS AHGNVAEGETKPDVDVTER*	A3G3F1	1769.7253 (2+)	1769.7239 (2+)	
		1N1H1NA	1124.5225 (3+)	1124.5214 (3+)	1
		1N1H2NA	1221.5528 (3+)	1221.5532 (3+)	0,3
Haptoglobin	VVLHPNYSQVDIGLIK*	A2G2	1139.8693 (3+)	1139.8691 (3+)	0,1
		A2G2F1	1188.5553 (3+)	1188.5551 (3+)	0,2
		A3G3	1261.5792 (3+)	1261.5799 (3+)	0,5
		A3G3F1	1310.2647 (3+)	1310.2659 (3+)	1
		A4G4	1383.2909 (3+)	1383.2906 (3+)	0,2
	MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK*	A4G4F1	1431.9771 (3+)	1431.9765 (3+)	0,4
		A2G2	1434.6615 (3+)	1434.6628 (3+)	0,9
		A2G2F1	1483.3479 (3+)	1483.3488 (3+)	0,6
		A3G3	1556.3728 (3+)	1556.3736 (3+)	0,5
		A3G3F1	1605.0605 (3+)	1605.0596 (3+)	0,6
Komplement faktor H	IPCSQPPQIEHGTINSSR*	A2G2	1215.1938 (3+)	1215.1944 (3+)	0,5
		A2G2F1	1263.8807 (3+)	1263.8804 (3+)	0,2
		A3G3	1336.9059 (3+)	1336.9051 (3+)	0,6
		A3G3F1	1385.5918 (3+)	1385.5911 (3+)	0,5
Clusterin 1	HNSTGCLR	A2G2	1284.0117 (2+)	1284.0128 (2+)	0,9

**Tabulka 6** Glykoformy sledované u haptoglobinu, hemopexinu a komplement faktoru H a značení používané v textu.

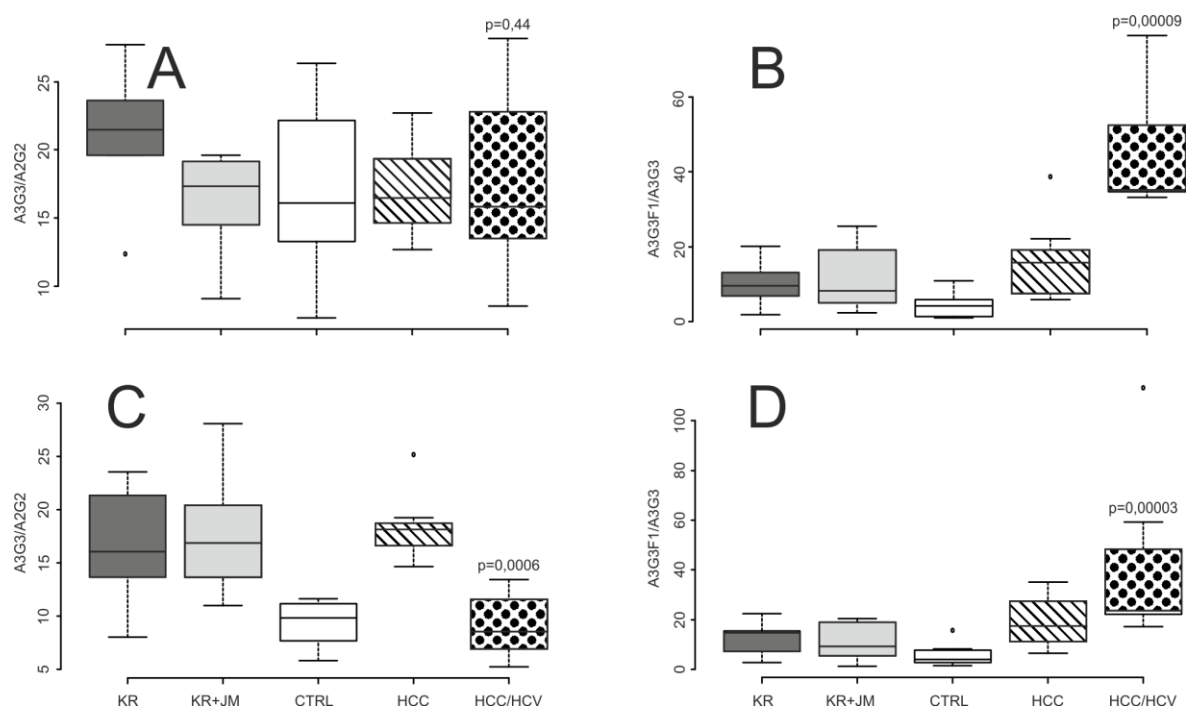
Struktura glykanu	Značení v textu
	A2G2
	A2G2F1
	A3G3
	A3G3F1
	1N1H1NA
	1N1H2NA

Obrázky 15 a 16 ukazují kvantitativní srovnání dvou haptoglobinových glykopeptidů nesoucí bi- (A2G2) a triantenární (A3G3F1, A3G3) glykany. Jedná se o peptid MVSHHNLTGATLINEQWLLTTAK (T1) a peptid VVLHPNYSQVDIGLIK (T3), oba s jedním N-glykosylačním motivem. Výsledek MRM kvantifikace poměrů glykoform pro peptid T1 (Obrázek 15) znázorňují panely A (A3G3/A2G2) a B (A3G3F1/A3G3) a výsledek na datech nezávislé kvantifikace pomocí FT-ICR je zobrazen na panelech C (A3G3/A2G2) a D (A3G3F1/A3G3). Sledovaný poměr A3G3/A2G2 měl v obou případech hodnotu  $p$ , vyjadřující platnost či neplatnost nulové hypotézy,  $> 0,05$ , čímž byla nulová hypotéza potvrzena, tedy soubory dat pro jednotlivá onemocnění se neliší. Tento poměr byl sledován z důvodu vyloučení výkyvů v kvantitě některé z glykoform. Panely B a D znázorňují nárůst fukosylované triantenární glykoformy v případě pacientů s HCC/HCV.  $P$ -hodnota  $> 0,05$  v případě kvantifikace pomocí FT-ICR svědčí pro tvrzení, že hodnoty v daných souborech se statisticky významně neliší, i když nárůst této glykoformy je na první pohled patrný.  $P$ -hodnoty v případě MRM kvantifikace lépe potvrzují a doplňují ukázaná data a výsledky jsou více konzistentní. Pacienti s HCC bez HCV a s oběma typy kolorektálního karcinomu se významně neodlišují od kontrolní skupiny.



**Obrázek 15** Kvantifikace N-glykopeptidu MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK haptoglobinu pro jednotlivé skupiny (KR-kolorektální karcinom, KR+JM-kolorektální karcinom s metastázemi do jater, CTRL-kontrola, HCC-hepatocelulární karcinom, HCC/HCV-hepatocelulární karcinom se žloutenkou typu C) s vyznačenou p-hodnotou. Panely v horní části znázorňují kvantifikaci poměru glykoform A3G3/A2G2 (A) a A3G3F1/A3G3 (B) pomocí MRM analýzy. Dolní panely znázorňují kvantifikaci glykoform A3G3/A2G2 (C) a A3G3F1/A3G3 (D) pomocí FT-ICR.

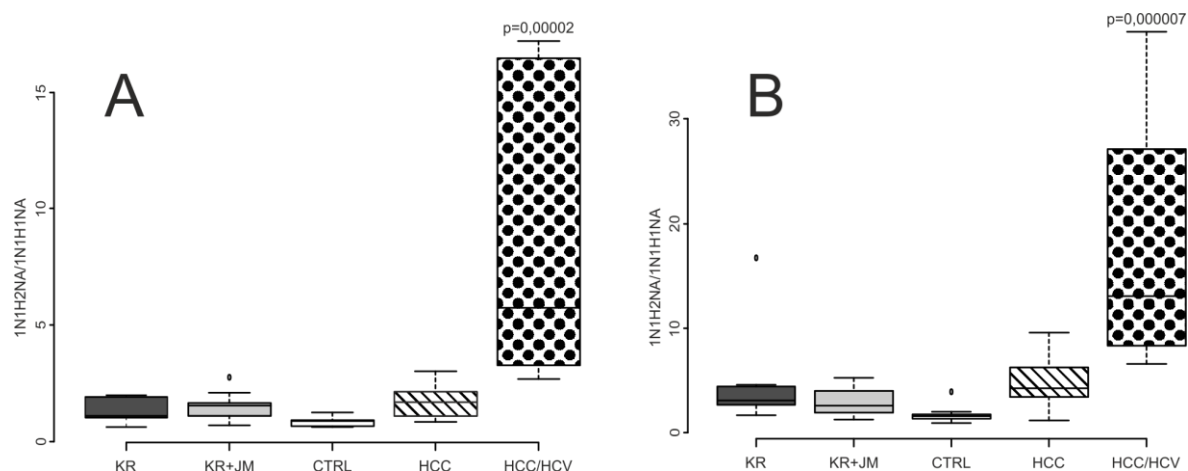
Výsledek kvantitativní analýzy pro peptid T3 haptoglobinu je znázorněn na Obrázku 16. Horní panely A a B znázorňují výsledek MRM analýzy a dolní panely C a D ukazují výsledek na datech nezávislé analýzy pomocí FT-ICR. V případě poměru glykoform A3G3/A2G2 kvantifikovaných pomocí FT-ICR znázorněném na panelu C je p-hodnota  $< 0,05$ , tedy soubory dat se mezi sebou statisticky liší na rozdíl od dat získaných pomocí MRM analýzy, kdy p-hodnota byla  $> 0,05$  a nejsou zde patrné žádné zásadní výkyvy v kvantitě srovnávaných glykoform pro všechny srovnávané skupiny. Panely B a D opět znázorňují nárůst fukosylované triantenární glykoformy v případě pacientů s HCC/HCV. P-hodnoty pro tato data byly v obou případech  $< 0,05$ . Je zde patrný drobný nárůst fukosylovaných glykoform i v případě HCC pacientů bez HCV, který je ale statisticky nevýznamný.



**Obrázek 16** Kvantifikace N-glykopeptidu VVLHPNYSQVDIGLIK haptoglobinu pro jednotlivé skupiny (KR-kolorektální karcinom, KR+JM-kolorektální karcinom s metastázemi do jater, CTRL-kontrola, HCC-hepatocelulární karcinom, HCC/HCV-hepatocelulární karcinom se žloutenkou typu C) s vyznačenou p-hodnotou. Panely v horní části znázorňují kvantifikaci poměru glykoforem A3G3/A2G2 (A) a A3G3F1/A3G3 (B) pomocí MRM analýzy. Dolní panely znázorňují kvantifikaci glykoforem A3G3/A2G2 (C) a A3G3F1/A3G3 (D) pomocí FT-ICR.

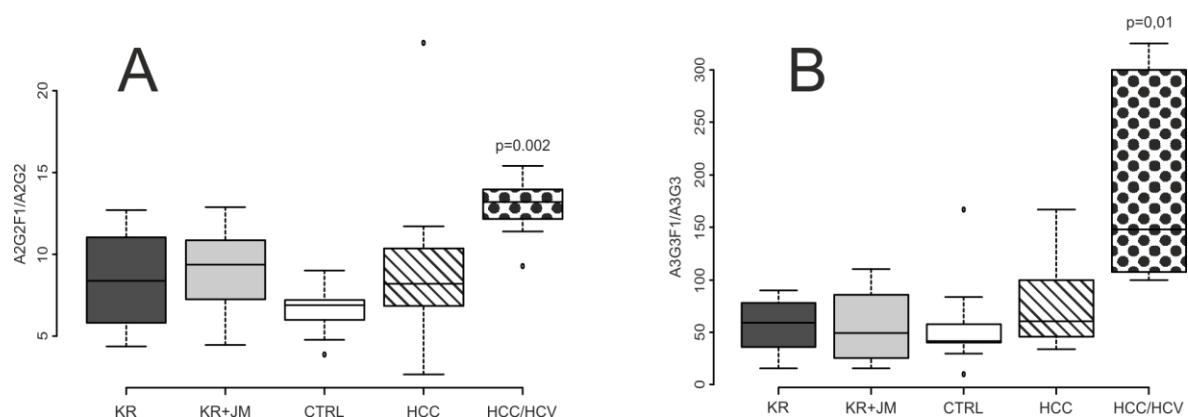
Dalším sledovaným proteinem byl hemopexin, u kterého byla kromě O-glykosylace peptidu TPLPPTSAHGNVAEGETKPDVDTER sledována také N-glykosylace peptidu SWPAVGNCSSALR.

Obrázek 17 znázorňuje MRM (A), a FT-ICR (B) kvantifikaci různě sialovaných T antigenů O-glykopeptidu TPLPPTSAHGNVAEGETKPDVDTER. V obou případech je viditelný značný nárůst struktury se dvěma kyselinami sialovým s p-hodnotami  $< 0,05$  v případě pacientů s HCC/HCV. Je viditelný mírný nárůst fukosylovaných struktur i v případě kolorektálního karcinomu, kolorektálního karcinomu s metastázemi a HCC bez žloutenky typu C, ale v porovnání se skupinou s HCC a žloutenkou typu C jsou tyto změny nevýznamné. Výsledky obou analýz jsou srovnatelné.



**Obrázek 17** Kvantifikace O-glykopeptidu TPLPPTSAHGNVAEGETKPDVDVTER hemopexinu pro jednotlivé skupiny (KR-kolorektální karcinom, KR+JM-kolorektální karcinom s metastázemi do jater, CTRL-kontrola, HCC-hepatocelulární karcinom, HCC/HCV-hepatocelulární karcinom se žloutenkou typu C) s vyznačenou p-hodnotou. Panely znázorňují kvantifikaci poměru glykoforem 1N1H2NA/1N1H1NA pomocí MRM analýzy (A) a pomocí FT-ICR (B).

Data pro N-glykopeptid SWPAVGNCSSALR hemopexinu (Obrázek 18) byla dohledávána dodatečně v datech získaných pomocí FT-ICR analýzy, a proto nejsou k dispozici data z MRM analýzy ke srovnání. U tohoto glykopeptidu byl sledován jak poměr fukosylovaných a nefukosylovaných triantenárních glykoforem A3G3F1/A3G3, tak poměr glykoforem biantenárních A2G2F1/A2G2. Nárůst fukosylovaných struktur není tak výrazný jako u dat znázorňujících nárůst sialovaných O-glykosylových struktur, ale p-hodnoty <0,05 potvrzují, že statisticky je nárůst fukosylace významný.

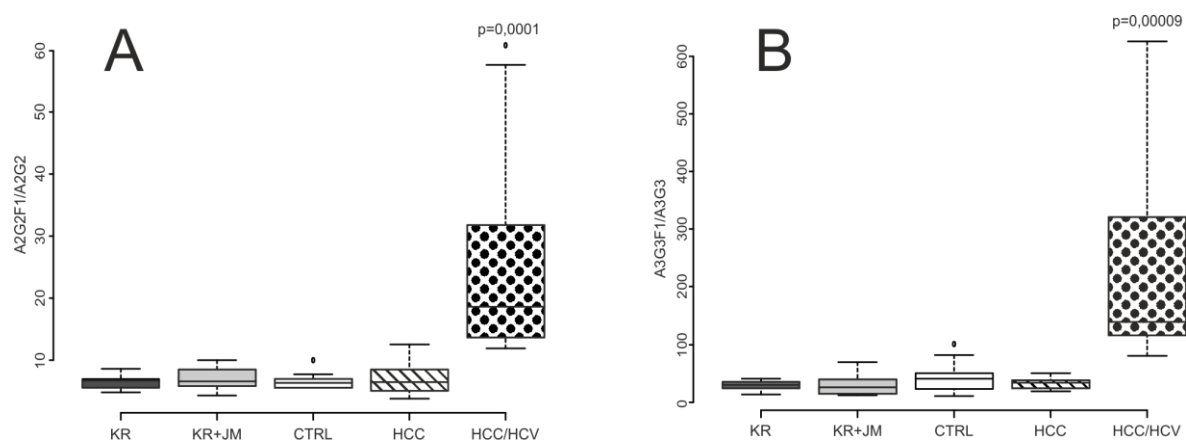


**Obrázek 18** Kvantifikace N-glykopeptidu SWPAVGNCSSALR hemopexinu provedené pomocí na datech nezávislé hmotnostní analýzy přístrojem FT-ICR pro jednotlivé skupiny (KR-kolorektální karcinom, KR+JM-kolorektální karcinom s metastázemi do jater, CTRL-kontrola, HCC-hepatocelulární karcinom, HCC/HCV-hepatocelulární karcinom se žloutenkou typu C) s vyznačenou p-hodnotou. Panel A znázorňuje poměr glykoforem A2G2F1/A2G2 a panel B poměr glykoforem A3G3F1/A3G3.



Při porovnání těchto dvou glykoform, je na první pohled podstatně větší nárůst v případě triantenární formy, ale p-hodnota poměru glykoform A2G2F1/A2G2 je nižší.

Posledním charakterizovaným a kvantifikovaným proteinem byl komplement faktor H, a jeho glykopeptid IPCSQPPQIEHGTINSSR. Byly sledovány stejné poměry glykoform jako v případě N-glykanů hemopexinu, triantenární fukosylovaná a nefukosylovaná forma A3G3F1/A3G3 a biantenární A2G2F1/A2G2. Výsledky jsou ukázány na Obrázku 19. Panel A zobrazuje poměr glykoform A2G2F1/A2G2 a panel B poměr glykoform A3G3F1/A3G3. Opět lze pozorovat trend zvýšené fukosylace v případě skupiny pacientů s HCC/HCV a téměř žádný nárůst fukosylace v případě skupin s kolorektálním karcinomem, kolorektálním karcinomem a metastázemi od jater a HCC bez HCV v porovnání s kontrolou.



**Obrázek 19** Kvantifikace N-glykopeptidu IPCSQPPQIEHGTINSSR komplementu faktoru H provedené pomocí na datech nezávislé hmotnostní analýzy přístrojem FT-ICR pro jednotlivé skupiny (KR-kolorektální karcinom, KR+JM-kolorektální karcinom s metastázemi do jater, CTRL-kontrola, HCC-hepatocelulární karcinom, HCC/HCV-hepatocelulární karcinom se žloutenkou typu C) s vyznačenou p-hodnotou. Panel A znázorňuje poměr glykoform A2G2F1/A2G2 a panel B poměr glykoform A3G3F1/A3G3.

## 7 Diskuze

První část této práce se zabývá izolací haptoglobinu ze směsných vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem, kolorektálním karcinomem s metastázemi do jater, hepatocelulárním karcinomem a kontrolní skupinou. Izolace ze směsných vzorků byla pilotní studií k ověření možnosti využití hmotnostního spektrometru FT-ICR pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých glykoform vybraných glykopeptidů haptoglobinu.

Izolace haptoglobinu pomocí hemoglobinu imobilizovaného na aktivovanou CNBr Sepharosu 4B byla úspěšná, ale jedná se o zdoluhavý, mnoha krokový proces, který by byl nevhodný pro případ analýzy velkého množství jednotlivých patientských vzorků. Bylo proto nutné vymyslet a optimalizovat proces přípravy vzorků, který bude jednoduchý a časově nenáročný. Jelikož je lidské sérum velmi komplexní vzorek, bylo nutné tuto proteinovou směs zjednodušit. Sérový albumin představuje v případě sledování ostatních proteinů značný problém. Jeho vysoké koncentrace v séru komplikují analýzu proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Rozhodli jsme se pro částečnou depleci sérového albuminu, založenou na principu jeho vysrážení pomocí 42 % etanolu. Tento proces zkrátil přípravu séra pro hmotnostní analýzu vybraných glykoproteinů, především haptoglobinu, z řádově několika dní na hodiny. Navíc je tato metoda finančně nenáročná. Zároveň nám tato metoda poskytla možnost sledovat ostatní proteiny sérové, které po depleci albuminu zůstaly ve směsi. Deplece albuminu není plně účinná, a proto byl sérový albumin přítomen mezi identifikovanými proteiny (Tabulka 4) a to dokonce jako první v pořadí. Díky sníženému množství albuminu bylo možné sledovat i méně zastoupené proteiny.

Během přípravy vzorků pro hmotnostně spektrometrickou analýzu byla použita neuraminidáza k odstranění sialových kyselin. Koncové sialové kyseliny, díky svým vlastnostem, komplikují detekci a charakterizaci glykoform tím, že zvyšují jejich variabilitu a snižují iontový signál. Mnohanásobné nabití iontů v případě ionizace pomocí elektrospreje navíc snižuje intenzitu signálu, z důvodu různého počtu nábojů u jedné glykoformy. Jelikož jsme se v naší studii zabývali především identifikací a kvantifikací fukosylovaných forem N-glykopeptidů, sialové kyseliny jsme mohli odstranit.

V případě izolovaného haptoglobinu byly pozorovány až čtyřikrát fukosylované glykoformy, což bylo možné díky citlivosti hmotnostního spektrometru s Fourierovou

transformací. Jednotlivé glykoformy byly přiřazeny na základě přesné hmoty, náboje a retenčního času.

Na základě analýzy směsných patientských sér bylo možné pozorovat zvýšenou několikanásobnou fukosylaci a celkový nárůst intenzity fukosylovaných struktur haptoglobinu ve vzorku pacientů s HCC. Tyto výsledky korelují s již dříve popsányi změnami struktur glykanů, především se zvýšenou fukosylací, pozorovanou v kontextu s nádorovými onemocněními<sup>15,36,67</sup>. Na základě těchto výsledků jsme v další části naší studie sledovali změny struktur glykopeptidů u jednotlivých pacientů s různým nádorovým onemocněním.

Díky procesu deplece albuminu, kdy je ze séra odstraněn pouze sérový albumin, bylo možné pomocí FT-ICR hmotnostně spektrometrické analýzy identifikovat 64 sérových proteinů na základě predikce hmoty tryptických štěpů. Správnost identifikovaných peptidů byla potvrzena CID fragmentací. Z těchto 64 proteinů jsme vybrali 15 nejhojnějších, u kterých byly nejprve dohledávány glykopeptidy se základní biantennární oligosacharidovou strukturou A2G2. Pokud byl tento glykopeptid nalezen a měl dostatečnou intenzitu, byly dále sledovány méně zastoupené glykoformy (Tabulka 5). U hemopexinu byly sledovány O-glykany 1N1H1NA a 1N1H2NA na peptidu TPLPPTSAHGNVAEGETKPDVDTER. Glykoforma A2G2 byla nalezena celkem u 5 proteinů (Tabulka 5). V případě Serotransferrinu a Clusterinu 1 neměly dále sledované glykoformy dostatečnou intenzitu pro kvantifikaci, a proto byly tyto dva proteiny ze studie vyloučeny.

Více fukosylované formy glykanů nebyly u jednotlivých patientských vzorků pozorovány z důvodu jejich velmi nízké koncentrace. V případě analýzy izolovaného haptoglobinu bylo na kolonu aplikováno 0,8 µg tryptických štěpů. Naproti tomu při analýze jednotlivých patientských vzorků byl po depleci albuminu aplikován 1 µg celkového množství trypticky štěpených proteinů. Zatím co u izolovaného haptoglobinu se jednalo o čistý protein, u depletovaného séra jde o komplexní proteinovou směs a intenzita jednotlivých glykoform je proto podstatně snížena.

Syntéza a glykosylace většiny sérových proteinů probíhá v játrech<sup>1</sup>. Původním cílem bylo tedy zjistit, zda kolorektální karcinom s metastázemi do jater ovlivní glykosylaci v játrech syntetizovaných proteinů v porovnání s kolorektálním karcinomem bez metastáz. Hepatocelulární karcinom je rakovina jater, ale původ této rakoviny se od kolorektálního karcinomu s metastázemi liší. Nebezpečí HCC vzniká u pacientů s předchozím

onemocněním jater, jako jsou žloutenka typu B a C nebo cirhóza. U této rakoviny podle našich předpokladů měla být glykosylace proteinů také pozměněna, což bylo prokázáno v mnoha publikacích<sup>34,36</sup>.

Výsledky ukázaly, že glykosylace se významně liší pouze v případě séra pacientů s HCC/HCV získaného z Georgetownské nemocnice. Pacienti s kolorektálním karcinomem nevykazovaly nárůst fukosylace v porovnání se vzorky kontrolní skupiny, skupiny s kolorektálním karcinomem bez metastáz a skupiny s HCC z Plzeňské nemocnice. Původní předpoklad byl, že zvýšení fukosylace způsobuje předchozí cirhotické onemocnění. Po získání etiologie pacientů z Plzeňské i Georgetownské nemocnice se ukázalo, že cirhóza se vyskytovala i ve čtyřech případech HCC pacientů získaných z Plzně a přesto v této skupině fukosylace v porovnání s kontrolou zvýšená nebyla, anebo pouze zanedbatelně. Rozdílem mezi oběma skupinami je předchozí infekce HCV. Žloutenku typu C prodělali všichni pacienti z Georgetownské nemocnice. HCC skupina z Plzeňské nemocnice má výskyt HCV ve všech případech negativní. Zdá se tedy, že žloutenka by mohla být příčinou změny v glykosylaci proteinů, tedy nárustu fukosylace. V tomto případě by změny v glykosylaci haptoglobinu nepoukazovaly na rakovinné onemocnění ale na infekci HCV. Tuto teorii by bylo nutné ověřit pokusem se třemi skupinami, kde by figurovala skupina pacientů s HCC/HCV, HCC/cirhózou bez HCV a HCC bez HCV a bez cirhózy. Také by bylo nutné získat více vzorků a nejlépe s podobným zastoupením mužů/žen, podobným věkovým rozptylem a stejným stádiem nemoci.

Velice vysoká p-hodnota v případě kvantifikace glykoformem A3G3F1/A3G3 N-glykopeptidu VVLHPNYSQVDIGLIK haptoglobinu pomocí FT-ICR (Obrázek 15) panel D, je pravděpodobně způsobena nízkou hodnotou mediánu. Nárůst fukosylace v případě pacientů s HCC/HCV je viditelný a hodnoty jsou oproti zbylým skupinám zvýšené, ale polovina hodnot této skupiny zvýšena není a medián se nachází v oblasti hodnot fukosylace, v jaké jsou skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem, kolorektálním karcinomem a metastázemi do jater, HCC a kontroly. V polovině případů by zvýšená fukosylace pozorována nebyla. V případě analýzy pomocí MRM je výsledek jednoznačný a fukosylace je zvýšena u všech pacientů s HCC/HCV.

Dále se vyskytuje velice nízká p-hodnota pro glykoformu A3G3/A2G2 N-glykopeptid MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK haptoglobinu, v případě kvantifikace pomocí FT-ICR (Obrázek 16) panel C. Tato odchylka je pravděpodobně způsobena chybou

v měření. V případě pacientů kontrolní skupiny a HCC/HCV byl signál pro glykoformy A2G2 a A3G3 buď velice slabý a data nebyla použita pro kvantifikaci nebo hledaná glykoforma nebyla vůbec nalezena. Tento fakt může být důvodem odchylky a neshody s MRM analýzou, kde žádná odchylka v množství jedné ze sledovaných glykoform pozorována není.

U kvantifikace N-glykopeptidu SWPAVGNCSSALR hemopexinu (Obrázek 18) byla p-hodnota nižší v případě poměru glykoform A2G2F1/A2G2 než u poměru glykoform A3G3F1/A3G3, kde je fukosylace více zvýšena. Nižší p-hodnotu u poměru glykoform A2G2F1/A2G2 lze vysvětlit tak, že v tomto případě je fukosylace zvýšena u všech pacientů oproti ostatním skupinám. V případě poměru triantenárních glykoform má polovina pacientů podobné hodnoty jako pacienti s HCC a proto není p-hodnota tak nízká, tedy skupiny se mezi sebou tolik neliší.

Kvantifikace pomocí MRM je jednou z nejvíce využívaných hmotnostně spektrometrických technik pro studium změn glykosylace proteinů. V naší studii jsme srovnávali tuto metodu s na datech nezávislou analýzou pomocí přístroje FT-ICR. Je to rychlá a citlivá metoda, která pro nás byla dostupná. Jak ukazují výsledky, kromě výše zmíněných tří odchylek u analýz N-glykopeptidů haptoglobinu, jsou výsledky pomocí MRM a FT-ICR srovnatelné a to i přes komplexnost vzorků. Díky snadné přípravě pomocí etanolové deplece, bylo možné glykopeptidy cílových proteinů identifikovat a kvantifikovat oběma metodami. V našem případě se jednalo celkem o 100 analýz prováděných paralelně pomocí MRM a FT-ICR.

Zároveň jsme díky na datech nezávislé analýze pomocí FT-ICR po identifikaci sérových proteinů (Tabulka 4) mohli zpětně dohledat a kvantifikovat N-glykoproteiny hemopexinu a komplement faktoru H, což nebylo možné v případě MRM analýzy, kde je nutné před provedením experimentu znát cílový analyt.

## 8 Závěr

Cílem této práce byla charakterizace změn glykosylace lidských sérových proteinů, především haptoglobinu u pacientů s různým nádorovým onemocněním pomocí dvou odlišných hmotnostně spektrometrických přístupů. Výsledky jsou shrnuty v následujících bodech:

- Byl izolován haptoglobin ze séra pomocí hemoglobinu, který byl imobilizován na aktivované CNBr Sepharose 4B.
- Díky izolaci byly charakterizovány glykoformy haptoglobinu ze spojených sér pomocí hmotností spektrometrie FT-ICR.
- Byl optimalizován postup přípravy séra pro hmotnostně spektrometrickou analýzu.
- Byly kvantifikovány glykoformy proteinů haptoglobinu, hemopexinu a komplement faktoru H pomocí MRM a FT-ICR hmotností spektrometrie.

## 9 Seznam použité literatury

- (1) Bekesova, S.; Kosti, O.; Chandler, K. B.; Wu, J.; Madej, H. L.; Brown, K. C.; Simonyan, V.; Goldman, R.: *J. Proteomics* **2012**, 75, 2216–2224.
- (2) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E.: *Essentials of glycobiology*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2009**.
- (3) Satomi, Y.; Shimonishi, Y.; Hase, T.; Takao, T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 2983–2988.
- (4) Pfeffer, S.; Dudek, J.; Gogala, M.; Schorr, S.; Linxweiler, J.; Lang, S.; Becker, T.; Beckmann, R.; Zimmermann, R.; Förster, F.: *Nat. Commun.* **2014**, 5, 3072.
- (5) Brockhausen, I.: *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, 1473, 67–95.
- (6) Roth, J.; Wang, Y.; Eckhardt, A. E.; Hill, R. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 8935–8939.
- (7) Williams, D.; Schachter, H.: *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 11247–11252.
- (8) Zhao, Y.-Y.; Takahashi, M.; Gu, J.-G.; Miyoshi, E.; Matsumoto, A.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.: *Cancer Sci.* **2008**, 99, 1304–1310.
- (9) Varki, A.: *Glycobiology* **1993**, 3, 97–130.
- (10) Dwek, R. A.: *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, 23, 1–25.
- (11) Goldman, R.; Ransom, H. W.; Varghese, R. S.; Goldman, L.; Bascug, G.; Loffredo, C. A.; Abdel-Hamid, M.; Gouda, I.; Ezzat, S.; Kyselova, Z.; Mechref, Y.; Novotny, M. V.: *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 1808–1813.
- (12) Wang, M.; Long, R. E.; Comunale, M. A.; Junaidi, O.; Marrero, J.; Di Bisceglie, A. M.; Block, T. M.; Mehta, A. S.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2009**, 18, 1914–1921.
- (13) Mori, S.; Aoyagi, Y.; Yanagi, M.; Suzuki, Y.; Asakura, H.: *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1998**, 13, 610–619.
- (14) Tsutsumi, M.; Wang, J. S.; Takada, A.: *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1994**, 18, 392–397.
- (15) Campion, B.; Léger, D.; Wieruszkeski, J. M.; Montreuil, J.; Spik, G.: *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184, 405–413.
- (16) Guo, Q.; Guo, B.; Wang, Y.; Wu, J.; Jiang, W.; Zhao, S.; Qiao, S.; Wu, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 417, 311–317.
- (17) Martín-Satué, M.; de Castellarnau, C.; Blanco, J.: *Br. J. Cancer* **1999**, 80, 1169–1174.
- (18) Taniguchi, N.; Endo, T.; Hart, G. W.; Seeberger, P. H.; Wong, C. H.: *Glycoscience: Biology and medicine*, Springer Japan, **2014**.
- (19) Sasaki, K.; Kurata-Miura, K.; Ujita, M.; Angata, K.; Nakagawa, S.; Sekine, S.; Nishi, T.; Fukuda, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 14294–14299.
- (20) El-Serag, H. B.; Rudolph, K. L.: *Gastroenterology* **2007**, 132, 2557–2576.
- (21) Shetty, K.; Timmins, K.; Brensinger, C.; Furth, E. E.; Rattan, S.; Sun, W.; Rosen, M.; Soulen, M.; Shaked, A.; Reddy, K. R.; Olthoff, K. M.: *Liver Transpl.* **2004**, 10, 911–918.
- (22) El-Serag, H. B.; Marrero, J. a.; Rudolph, L.; Reddy, K. R.: *Gastroenterology* **2008**, 134, 1752–1763.
- (23) Llovet, J. M.; Bruix, J.: *J. Hepatol.* **2008**, 48, 20–37.
- (24) Nakagawa, T.; Miyoshi, E.; Yakushijin, T.; Hiramatsu, N.; Igura, T.; Hayashi, N.; Taniguchi, N.; Kondo, A.: *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 2222–2233.
- (25) Kuzmanov, U.; Kosanam, H.; Diamandis, E. P.: *BMC Med.* **2013**, 11, 31.
- (26) Kapitulnik, J.; Maines, M.D.: *Front. Pharmacol.* **2012**, 3, 136.

- (27) Mao, S. J.; Yates, M. T.; Jackson, R. L.: *Methods Enzymol.* **1994**, 234, 505–513.
- (28) Kristiansen, M.; Graversen, J. H.; Jacobsen, C.; Sonne, O.; Hoffman, H. J.; Law, S. K.; Moestrup, S. K.: *Nature* **2001**, 409, 198–201.
- (29) Politicelli, F.; Bocedi, a; Minervini, G.; Ascenzi, P.: *FEBS J.* **2008**, 275, 5648–5656.
- (30) Langlois, M. R.; Delanghe, J. R.: *Clin. Chem.* **1996**, 42, 1589–1600.
- (31) Wejman, J. C.; Hovsepian, D.; Wall, J. S.; Hainfeld, J. F.; Greer, J.: *J. Mol. Biol.* **1984**, 174, 343–368.
- (32) Ettrich, R.; Brandt, W.; Jr, K.; Baumruk, V.: *Biol. Chem.* **2002**, 383, 1667–1676.
- (33) Chandler, K. B.; Pompach, P.; Goldman, R.; Edwards, N.: *J. Proteome Res.* **2013**, 12, 3652–3666.
- (34) Wang, D.; Hincapie, M.; Rejtar, T.; Karger, B. L.: *Anal. Chem.* **2012**, 83, 2029–2037.
- (35) Ang, I. L.; Poon, T. C. W.; Lai, P. B. S.; Chan, A. T. C.; Ngai, S.; Hui, A. Y.; Johnson, P. J.; Sung, J. J. Y.: *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 2691–2700.
- (36) Pompach, P.; Brnakova, Z.; Sanda, M.; Wu, J.; Edwards, N.; Goldman, R.: *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12, 1281–1293.
- (37) Zhang, S.; Shu, H.; Luo, K.; Kang, X.; Zhang, Y.; Lu, H.; Liu, Y.: *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 1621–1628.
- (38) Okuyama, N.; Ide, Y.; Nakano, M.; Nakagawa, T.; Yamanaka, K.; Moriwaki, K.; Murata, K.; Ohigashi, H.; Yokoyama, S.; Eguchi, H.; Ishikawa, O.; Ito, T.; Kato, M.; Kasahara, A.; Kawano, S.; Gu, J.; Taniguchi, N.; Miyoshi, E.: *Int. J. cancer* **2006**, 118, 2803–2808.
- (39) Miyoshi, E.; Shinzaki, S.; Moriwaki, K.; Matsumoto, H.: *Methods Enzymol.* **2010**, 478, 153–164.
- (40) Miyoshi, E.; Moriwaki, K.; Terao, N.; Tan, C.-C.; Terao, M.; Nakagawa, T.; Matsumoto, H.; Shinzaki, S.; Kamada, Y.: *Biomolecules* **2012**, 2, 34–45.
- (41) Takeda, Y.; Shinzaki, S.; Okudo, K.; Moriwaki, K.; Murata, K.; Miyoshi, E.: *Cancer* **2012**, 118, 3036–3043.
- (42) Boonyapranai, K.; Tsai, H. Y.; Chen, M. C. M.; Sriyam, S.; Sinchaikul, S.; Phutrakul, S.; Chen, S. T.: *Electrophoresis* **2011**, 32, 1422–1432.
- (43) Blomme, B.; Van Steenkiste, C.; Callewaert, N.; Van Vlierberghe, H.: *J. Hepatol.* **2009**, 50, 592–603.
- (44) Pabst, M.; Altmann, F.: *Proteomics* **2011**, 11, 631–643.
- (45) Ruhaak, L. R.; Deelder, A. M.; Wuhrer, M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 163–174.
- (46) Wuhrer, M.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H.: *J. Chromatogr. B.* **2005**, 825, 124–133.
- (47) Wuhrer, M.; Catalina, M. I.; Deelder, A. M.; Hokke, C. H.: *J. Chromatogr. B.* **2007**, 849, 115–128.
- (48) Zaia, J.: *Mass Spectrom Rev.* **2014**, 28, 254–272.
- (49) Mechref, Y.: *Electrophoresis* **2012**, 32, 3467–3481.
- (50) Zhang, H.; Li, X. J.; Martin, D. B.; Aebersold, R.: *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 660–666.
- (51) Wuhrer, M.: *Glycoconj. J.* **2013**, 30, 11–22.
- (52) Brown, W. E.; Wold, F.: *Biochemistry* **1973**, 12, 835–840.
- (53) Evnin, L. B.; Vasquez, J. R.; Craik, C. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 6659–6663.
- (54) Yang, Z.; Harris, L. E.; Palmer-Toy, D. E.; Hancock, W. S.: *Clin. Chem.* **2006**, 52, 1897–1905.



- (55) Pompach, P.; Chandler, K. B.; Lan, R.; Edwards, N.; Goldman, R.: *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 1728–1740.
- (56) Zauner, G.; Kozak, R. P.; Gardner, R. a; Fernandes, D. L.; Deelder, A. M.; Wuhler, M.: *Biol. Chem.* **2012**, *393*, 687–708.
- (57) Sleno, L.; Volmer, D. A.: *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091–1112.
- (58) Yamashitat, M.; Fenn, J. B.: *J Phys.Chem.* **1984**, *434*, 4451–4459.
- (59) Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, R. C. K.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L.: *Clin. Biochem. Rev.* **2003**, *24*, 3–12.
- (60) Pitt, J. J.: *Clin. Biochem. Rev.* **2009**, *30*, 19–34.
- (61) Christopher, G. H. ; Johnstone, R. A.; Ed, W.: *Mass Spectrometry Basics*, 1. vydání, CRC Press, **2003**.
- (62) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.: *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *215*, 59–75.
- (63) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S.: *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1–35.
- (64) Ceroni, A.; Maass, K.; Geyer, H.; Geyer, R.; Dell, A.; Haslam, S. M.: *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1650–1659.
- (65) Strohalm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V.: *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4648–4651.
- (66) Sanda, M.; Pompach, P.; Brnakova, Z.; Wu, J.; Makambi, K.; Goldman, R.: *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 1294–1305.
- (67) Miyoshi, E.; Nakano, M.: *Proteomics* **2008**, *8*, 3257–3262.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Datum	Poznámka